

**ON-LINE BILDANALYSE AM TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOP
ZUR ABSCHÄTZUNG STRUKTURELLER UND ELEMENTARER EIGENSCHAFTEN
BIOLOGISCHER DÜNNSCHNITTE**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr.rer.nat. im Fachbereich Physik

der Universität Bremen

vorgelegt von

ANDRES KRIETE

aus Bremen

Bremen 1985

Abstract

Kriete, Andres:

On-line Bildanalyse am Transmissionselektronenmikroskop zur Abschätzung struktureller und elementarer Eigenschaften biologischer Dünnschnitte

Es werden Anlagen und Methoden zur digitalen on-line Bildanalyse am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) vorgestellt. Die Arbeit umfaßt die Systemanalyse der Abtasteinrichtungen, die Bildvorverarbeitung und die Bildauswertung struktureller und elementarer Eigenschaften schwermetallfixierter biologischer Dünnschnitte unter den Bedingungen des Streuabsorptionskontrastes. Die Methoden zur Bildanalyse werden unter einem informationstheoretischen Aspekt systematisiert.

Es werden drei verschiedene TEM/TV-Adapter, einschließlich eines Faserplattenanschlusses mit einer LLL-TV-Kamera, vergleicht und untersucht. Neben der Messung der Modulationsübertragungsfunktion und der Intensitätsübertragungsfunktion wird der äquivalente Quantennutzeffekt und die Informationsdichte bestimmt. Die Ergebnisse werden mit einer Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik zusammengefaßt.

Zur Bildvorverarbeitung werden verschiedene Methoden erprobt. Neben der Anwendung eines Noise-Cheating-Verfahrens kommen Fokuskriterien zur Schärfereinstellung des TEM zum Einsatz.

Zur Bildauswertung struktureller Eigenschaften biologischer Schnitte wird aus einem Modell der physiologischen Optik eine Texturanalyse entwickelt, die charakteristische Punkte in der zweiten Ableitung der Bildfunktion statistisch auswertet. Die Methode wird zur Analyse der Chromatinstruktur von tumorveränderten Zellkernen eingesetzt.

Zur Auswertung elementarer Eigenschaften wird eine polychromatische Methode erprobt, die die Variation des Streuabsorptionskontrastes bei Änderung der Beschleunigungsspannung ausnutzt. Aus theoretischen Berechnungen werden Formalismen abgeleitet und erprobt, die eine Aussage über die Massendickeverteilung und die relative Elementzusammensetzung zulassen. Diese Ergebnisse werden mit den analytischen Möglichkeiten des STEM verglichen.

**ON-LINE BILDANALYSE AM TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOP
ZUR ABSCHÄTZUNG STRUKTURELLER UND ELEMENTARER EIGENSCHAFTEN
BIOLOGISCHER DÜNNSCHNITTE**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr.rer.nat. im Fachbereich Physik

der Universität Bremen

vorgelegt von

ANDRES KRIETE

aus Bremen

Bremen 1985

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Physik
der Universität Bremen

Die Dissertation lag dem Promotionsausschuß Dr.rer.nat.
der Universität Bremen vor. An dem Promotionsverfahren
haben Prof.Dr.S.Boseck (Bremen) und Dr.W.Kunath (Berlin)
als Gutachter mitgewirkt. Das Kolloquium fand am
21.10.1985 statt.

Vorgelegt von

ANDRÉS KRISTE

aus Bremen

Bremen 1985

Abstract

Kriete, Andres:

On-line Bildanalyse am Transmissionselektronenmikroskop zur Abschätzung struktureller und elementarer Eigenschaften biologischer Dünnschnitte

Es werden Anlagen und Methoden zur digitalen on-line Bildanalyse am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) vorgestellt. Die Arbeit umfaßt die Systemanalyse der Abtasteinrichtungen, die Bildvorverarbeitung und die Bildauswertung struktureller und elementarer Eigenschaften schwermetallfixierter biologischer Dünnschnitte unter den Bedingungen des Streuabsorptionskontrastes. Die Methoden zur Bildanalyse werden unter einem informationstheoretischen Aspekt systematisiert.

Es werden drei verschiedene TEM/TV-Adapter, einschließlich eines Faserplattenanschlusses mit einer LLL-TV-Kamera, vergleichend untersucht. Neben der Messung der Modulationsübertragungsfunktion und der Intensitätsübertragungsfunktion wird der äquivalente Quantennutzeffekt und die Informationsdichte bestimmt. Die Ergebnisse werden mit einer Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik zusammengefaßt.

Zur Bildvorverarbeitung werden verschiedene Methoden erprobt. Neben der Anwendung eines Noise-Cheating-Verfahrens kommen Fokuskriterien zur Schärfereinstellung des TEM zum Einsatz.

Zur Bildauswertung struktureller Eigenschaften biologischer Schnitte wird aus einem Modell des physiologischen Optik eine Texturanalyse entwickelt, die charakteristische Punkte in der zweiten Ableitung der Bildfunktion statistisch auswertet. Die Methode wird zur Analyse der Chromatinstruktur von tumorveränderten Zellkernen eingesetzt.

Zur Auswertung elementarer Eigenschaften wird eine polychromatische Methode erprobt, die die Variation des Streuabsorptionskontrastes bei Änderung der Beschleunigungsspannung ausnutzt. Aus theoretischen Berechnungen werden Formalismen abgeleitet und erprobt, die eine Aussage über die Massendickeverteilung und die relative Elementzusammensetzung zulassen. Diese Ergebnisse werden mit den analytischen Möglichkeiten des STEM verglichen.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1982 bis 1985 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg. Das innerhalb des Sonderforschungsbereiches SFB 105 (Titel: Zytologische Grundlagen der experimentellen Biologie) bestehende biomedizinische Bildverarbeitungs-labor ermöglichte auf Grund der vorhandenen Hard- und Software einen raschen Aufbau einer on-line Bildverarbeitung am Elektronenmikroskop. Dem Dekan der medizinischen Fakultät, Herrn Prof.V.ter Meulen, und dem Leiter der Arbeitsgruppe, Herrn Dr.H.M.Aus, danke ich für die Bemühungen um den Aufbau des Systems und das stetige Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof.Dr.S.Boseck, Universität Bremen, danke ich für die Idee zu dieser Arbeit, ihrer stetigen Förderung und den gewährten wissenschaftlichen Ratschlägen.

Besonders danke ich auch Herrn Dr.W.Kunath, Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Elektronenmikroskopie, Berlin, für die Übernahme des Korreferats und für die wertvolle Kritik und Anregung. Herrn Prof.E.Zeitler und den Mitarbeitern des Instituts danke ich für das entgegengebrachte Interesse.

Vergleichende Messungen wurden mit freundlicher Zustimmung von Herrn Hofrat Dr.H.Horn am Forschungszentrum für Elektronenmikroskopie in Graz, Österreich, durchgeführt. Herrn Dr.F.Hofer danke ich für die Unterstützung bei den Messungen und den wertvollen Anregungen bei der Interpretation der Ergebnisse.

Meinen Kollegen am Institut für Virologie, insbesondere Herrn Dr.H.Harms, sei für die vielfältige Unterstützung gedankt, ebenso den Mitarbeitern am Institut für Pathologie, insbesondere Herrn Dr.R.Schäffer für die Überlassung der Präparate, und Herrn F.Meinl, Zeiss Zweigniederlassung, München, für die Mithilfe bei der Anpassung der Bildaufnahmesysteme.

I.	<u>Zusammenstellung der wichtigsten Formelzeichen</u>	1
II.	<u>Einleitung</u>	2
II.1	Stand der Bildanalyse in der Elektronenmikroskopie	2
II.2	Zielsetzung und Aufbau der Arbeit	7
III.	<u>Theoretische Grundlagen zum Streuabsorptionskontrast und zur Bildanalyse</u>	12
III.1	Der Streuabsorptionskontrast	12
III.2	Das Bilderfassungssystem als Übertragungskette	15
III.3	Die Modulationsübertragungsfunktion	20
III.4	Das Elektronenrauschen und die DQE	25
III.5	Die Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik	28
IV.	<u>Material und Experiment</u>	31
IV.1	Aufbau und Betrieb des Bilderfassungssystems	31
IV.2	<u>Bestimmung der Systemeigenschaften</u>	35
IV.2.1	Wandlungsprozesse im Bilderfassungssystem	35
IV.2.2	Die Messung der Modulationsübertragungsfunktion	38
IV.2.3	Die Messung der Intensitätsübertragungsfunktion	41
IV.2.4	Die Messung des Rauschens im digitalen Bereich	47
IV.2.5	Die Bestimmung der DQE	52
IV.2.6	Die Bestimmung der Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik	54
IV.2.7	Die Bestimmung der Informationsdichte und Kapazität	59
IV.2.8	Zusammenfassung der Systemeigenschaften	60
IV.3.	<u>Bildvorverarbeitung</u>	63
IV.3.1	Einleitung	63
IV.3.2	Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Bildakkumulation	65
IV.3.3	Ein Algorithmus zur Filterung des Rauschens	69
IV.3.4	Analyse und Reduktion systembedingter Störungen und Inhomogenitäten	72
IV.3.5	Erprobung von Fokuskriterien im unteren elektronenmikroskopischen Vergrößerungsbereich	77
IV.3.6	Ein iteratives Verfahren zum Bildalignement	81
IV.3.7	Zusammenfassung des Teils Bildvorverarbeitung	99

IV.4	<u>Strukturell-analytischer Teil</u>	101
IV.4.1	Einleitung	101
IV.4.2	Die Aufgabenstellung	103
IV.4.2	Das Modell des visuellen Texturempfindens	105
IV.4.3	Realisierung und Eigenschaften der Texturanalyse	106
IV.4.4	Die medizinische Anwendung	110
IV.4.5	Zusammenfassung des strukturell-analytischen Teils	115
IV.5	<u>Elementar-analytischer Teil</u>	117
IV.5.1	Einleitung	117
IV.5.2	Ein Weg zur Realisierung des polychromatischen Bildes	119
IV.5.3	Anwendung der Methode auf biologische Dünnschnitte	131
IV.5.4	Durchführung und Auswertung von Messungen am STEM	139
IV.5.4.1	Das STEM-Backscattersignal	141
IV.5.4.2	Untersuchung energiegefilterter Bilder	144
IV.5.4.3	EDX-Messungen relativer Konzentrationen	149
IV.5.5	Zusammenfassung des elementar-analytischen Teils	153
V.	<u>Diskussion</u>	155
VI.	<u>Ausblick</u>	163
A.	<u>Anhang</u>	165
A.1	Abschätzung der Temperaturerhöhung des Präparates bei Elektronenbestrahlung	165
A.2	Diskussion der Rose-Gleichung und Vergleich mit digitalen Kriterien	166
	<u>Summary</u>	171
	<u>Literaturverzeichnis</u>	173

Die zur Dissertation erstellten Programme können auf Anfrage vom Institut für Virologie, Würzburg, in einer maschinenlesbaren Form zur Verfügung gestellt werden.

Soweit nicht anders angegeben, sind die elektronenmikroskopischen Abbildungen im Maßstab 10000:1 (1cm=1µm) wiedergegeben. Literaturzitate sind durch Schrägstriche gekennzeichnet und beziehen sich auf das alphabetisch geordnete Literaturverzeichnis.

I. Zusammenstellung der wichtigsten Formelzeichen

a_0 = Aperturwinkel	n_0 u. N_0 = Anzahl primärer Strahlelektronen
a_H = Bohrscher Atomradius	N = Rauschen
A = Atomgewicht	N_A = Avogadrokonstante
A_C = Betr. Chrominanzvektor	OTF = Abk. für Optical Transfer Function
AGC = Abk. für Automatic Gain Control	$P(u)$ = Phasenspektrum
c = Quantenausbeute	q = Ladungsdichte
C = Modulationskontrast	RGB = Abk. für Rot-Grün-Blau Farbsignal
d^2 = Apertur	s^2 = Objektfläche
d' = Detektierbarkeit	S = gesendetes Signal
D = Dämpfungsfaktor	S' = empfangenes Signal
DE = Abk. für Detection Efficiency	SNR = Abk. für Signal to Noise Ratio
DQE = Abk. für Detective Quantum Efficiency	t = Abtastzeit
e = Elementarladung	T' = Temperaturerhöhung
f = Frequenz	u, v = Ortsfrequenzkoordinaten
$\mathcal{F}$ = Fouriertransformation	U = Beschleunigungsspannung
G = Grauwert	UVY = Farbvalenzen
H = Entropie	x, y = Ortskoordinaten
H_k = Entropie eines Koppel- feldes mit k Pixeln	Z = Ordnungszahl
I = Intensität	α = Aperturwinkel
ITF = Abk. für Intensity Transfer Function	β = Sehwinkel
$k(x)$ = Kantenantwort	σ^2 = Varianz
K = physiol. Kontrast	$d(\alpha_0)$ = Wirkungsquerschnitt
$l(x)$ = Linienantwort	φ = Farbwinkel
$m_0 v^2$ = Energie des Elektrons	η = Rückstreuoeffizient
m_x = Massendicke	λ = Wellenlänge
M = Vergrößerung	
MTF = Abk. für Modulation Transfer Function	

II. Einleitung

II.1 Stand der Bildanalyse in der Elektronenmikroskopie

Unter den gemeinsamen Stichworten "Elektronenmikroskopie" und "Computer" wies das Deutsche Institut für medizinische Information und Dokumentation (DIMDI, Köln) in den Jahren 1979-1984 13000 publizierte Arbeiten auf. Davon beschäftigten sich nur fünf Veröffentlichungen mit der direkten, digitalen on-line Bildverarbeitung. Die Zahlen zeigen das große Entwicklungspotential auf diesem Gebiet an, begünstigt durch steigende Rechnerleistung, sinkende Hardwarekosten und den Fortschritten auf dem Gebiet der Sensortechnik. Der Computer wird dabei nicht nur zur Auswertung der in überwiegend bildlicher Information anfallenden Meßergebnisse, sondern auch zunehmend zur Automatisierung des Elektronenmikroskops selbst eingesetzt.

Zunächst erfolgte die Analyse elektronenmikroskopischer Bilder nur an Mikrografien kohärent-lichtoptisch /Klug und Berger, 1964; Hoppe et al., 1968; Boseck u. Lange, 1970; Thon, 1971/. Bei diesen Arbeiten stand die Strukturaufklärung regelmäßiger Kristalle und die Kontrolle der Abbildungseigenschaften des Elektronenmikroskops im Vordergrund. Die Nachteile der fotografischen Aufzeichnung bezüglich der nicht sofort verfügbaren Bildinformation, der Nichtlinearität zwischen aufbelichteter Elektronendichteverteilung und der entwickelten Schwärzung, insbesondere aber Aspekte der Strahlenschädigung sind für viele quantitative Aufgaben hinderlich. Mit der Entwicklung der digitalen Bildverarbeitung und den sich hieraus für die Elektronenmikroskopie abzeichnenden Möglichkeiten wurden in den letzten Jahren Anstrengungen unternommen, neben einer off-line Verarbeitung nach mikrodensitometrischer Abtastung das elektronenmikroskopische Bild on-line zu verarbeiten. Diese Möglichkeit blieb zunächst den Raster(transmissions)elektronenmikroskopen (S(T)EM) vorbehalten, da es hier relativ einfach ist, die sequentiell anfallenden Daten aufzunehmen /Hawkes, 1980; mehrere Arbeiten in Ultramicroscopy 8, 1982 und Journal of Microscopy, 127, 1982/.

Die Verwendung von Restlichtverstärkerkameras am konventionellen Transmissionselektronenmikroskop (CTEM) wurde Mitte der sechziger Jahre vorgeschlagen /Haine, 1955/. Diese Low-Light-Level-(LLL)-TV-Systeme fanden zunächst nur als Beobachtungshilfe Verwendung. Neben Kanalplatten /English und Venables, 1971/ und Halbleitertargets /Herrmann et al., 1971/ wurden Detektoren mit TV-Abtastsystemen eingesetzt /Anderson, 1968; Alsberg und Hartman, 1976/. Die Lebensdauer dieser Systeme ist durch die Strahlenschäden der direkt den Elektronen ausgesetzten Targets begrenzt. Als praktikabel erscheint der Einsatz empfindlicher TV-Kameras, die die auf einem Szintillator abgebildete Elektro-nendichte-Verteilung abtasten.

Ein on-line Bildverarbeitungssystem am TEM, bestehend aus TV-Bildverstärkeranlage und digitalem Bildspeicher, wurde erstmals am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft in Berlin entwickelt und eingesetzt /Herrmann et al., 1976; Rust, 1982; Kunath et al., 1984/. Die ersten Ergebnisse zeigen, daß mit einer solchen Anlage bei einer um den Faktor 10^3 verringerten primären Elektronenstrahldichte eine Strukturaufklärung an empfindlichen molekularen Objekten möglich ist /Ottensmeyer et al., 1978/.

Da in jüngster Zeit erstmals verschiedene Kamerasysteme mit TEM-Anschlüssen kommerziell verfügbar sind, stellt sich die Frage nach der Leistungsfähigkeit und praktischen Eignung solcher Konfigurationen. Dazu bedarf es einer umfassenden Systemanalyse. Einen Ansatz liefern die theoretischen Überlegungen und Messungen an Restlichtverstärkersystemen /Rust, 1982; Herrmann, 1984; Kunath et al., 1984/.

Ausgehend von einer Systemanalyse kann beurteilt werden, ob eine Bildvorverarbeitung notwendig ist. Die Bildvorverarbeitung (enhancement, restoration, encoding) bringt das Bild in eine für die weitere Verarbeitung geeignete Form. In der Elektronenmikroskopie sind neben Methoden zur Rauschfilterung /Hawkes, 1984/ insbesondere off-line Verfahren zur Unterstützung der Schärfeeinstellung diskutiert worden /Boseck, 1971; Felten, 1981/. Die direkte Bilderfassung bietet die Möglichkeit einer on-line Methode.

Einen ersten Überblick über die universelle Verwendbarkeit der digitalen Bildverarbeitung am TEM zeigt die Abbildung 1. Für die Vergrößerungsstufen 3150 und 200000 fach ist dem TV-Signal der in der Arbeit beschriebenen Anlage das digital verarbeitete Bild gegenübergestellt. Besonders eindrucksvoll ist die Detektion atomarer Gitterstrukturen des Kohlenstoffs aus dem Elektronen rauschen (c) nach Bildakkumulation (d). Bei der Interpretation struktureller Eigenschaften im molekularen und atomaren Bereich ist die Kenntnis der Phasenkontrastübertragungsfunktion unerlässlich, die sich als Folge mehrerer Abbildungsfehler des Elektronenmikroskops als komplizierte Funktion mit wechselndem Vorzeichen darstellt. Hierzu wurden mit Hilfe digitaler Technik theoretische Berechnungen und Auswertungen durchgeführt worden /Lenz, 1971; Hanszen, 1973/. Durch solche Überlegungen ist die dreidimensionale Rekonstruktion im molekularen Bereich erst möglich geworden /Hoppe, 1974; Unwin und Klug, 1974/.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf den unteren Vergrößerungsbereich, wobei der Zellkern nach Abbildung 1a ein typisches Untersuchungsobjekt darstellt. Die Analyse für den Morphologen interessanter struktureller Eigenschaften erfolgte bisher nur visuell oder mit manuell-optischen Planimetern. Diese interaktiven Systeme sind jedoch kaum in der Lage komplexe, aber physiologisch und pathologisch relevante Strukturen zu quantifizieren. Ein Beispiel ist die Chromatinstruktur im Zellkern, die sich als ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Krankheitsbildes von Tumoren erwiesen hat. In der Lichtmikroskopie sind in den letzten Jahren Verfahren entwickelt worden, um solche Strukturen zu bewerten /DFVLR-Bericht, 1984/. Die Entwicklung eines automatisierten Verfahrens am Elektronenmikroskop bietet die Möglichkeit zur Untersuchung des Krankheitsbildes im ultrastrukturellen Bereich, mit einer Verbesserung der Meßgenauigkeit und Reproduzierbarkeit.

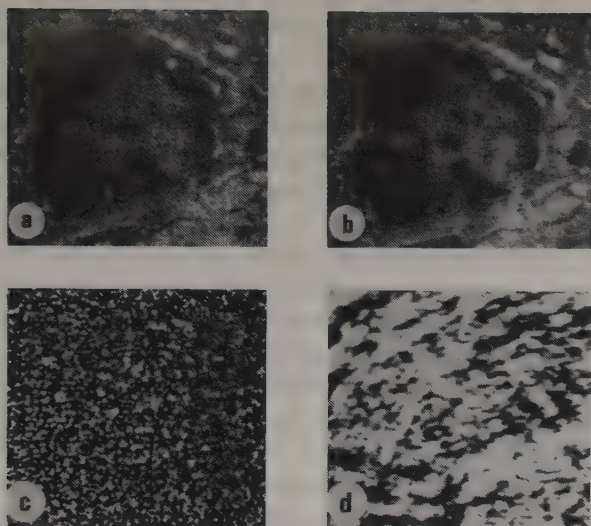


Fig.1 Zwei Beispiele für die digitale Bildverarbeitung an elektronenmikroskopischen Bildern:
 Der Scan einer LLL-TV-Kamera zeigt einen Zellkern (a) im Maßstab 10000:1 mit einem angedeuteten Elektronenrauschen, durch Bildakkumulation in (b) verringert. Der Balken repräsentiert die Länge von 1 μm .
 Im Maßstab 2000000:1 (Balkenlänge entspricht 5 nm) sind die Abbildungen (c) und (d) wiedergegeben, die die Detektion der atomaren 0,34 nm Gitterstrukturen des Kohlenstoffs im Elektronenrauschen nach Bildakkumulation demonstrieren

Bei der Charakterisierung biologischer Objekte rücken neben strukturellen Fragestellungen immer mehr elementar-analytische Aspekte in den Vordergrund. So wird die Bestimmung der Trockenmasse als ein nützliches Hilfsmittel in der Zytochemie angesehen /Glick, 1977, 1980/. Am Transmissionselektronenmikroskop kann die Bestimmung der Trockenmasse an isolierten biologischen Objekten im Bereich von 10^{-11} bis 10^{-18} Gramm photometrisch erfolgen /Zeitler und Bahr, 1962; Bahr und Zeitler, 1965; Zeitler und Bahr, 1965/. In jüngerer Zeit ist es gelungen, die detektierbare Masse für isolierte Objekte auf $2 \cdot 10^{-19}$ Gramm durch die Benutzung des TEM-Dunkelfeldes zu verringern /Brakenhoff et al., 1972/. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops konnte dieser Bereich bis auf 10^{-20} Gramm verringert werden /Langmore, 1976; Engel, 1978/.

Die Bestimmung der Trockenmasse spielt auch dann eine wichtige Rolle, wenn Elementverteilungen in Massendickenanteile ausgedrückt werden sollen /Linders et al., 1980, 1981; Leapman, 1984/, wie z.B. in der Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS). Elementare Aussagen können am STEM auch durch Bildkombination von Signalen unterschiedlicher physikalischer Natur abgeleitet werden (Z-Kontrast Verfahren) /Chapman und Craven, 1984/. Diese elementar-analytischen Methoden versagen aus Gründen des Massendickeneinflusses an schwermetallfixierten Dünnschnitten.

Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ergibt sich aus der Radiologie. Hier wurde ein polychromatisches Verfahren diskutiert, bei dem zur stofflich selektiven Detailwiedergabe neben der reinen Helligkeitsmodulation der Röntgenstrahlung auf Grund von Absorption auch diejenige Information ausgenutzt wird, die eine andere Wellenlänge der Röntgenstrahlung beim Weg durch das zu untersuchende Material mitbringt /Backmund und Boseck, 1969/. Ziel einer zu entwickelnden polychromatischen, elektronenmikroskopischen Methode sollte sein, neben der Aussage über die Massendickenverteilung eine Abschätzung der relativen Elementzusammensetzung an kontrastierten biologischen Dünnschnitten unter den Bedingungen des Streuabsorptionskontrastes zu erbringen.

II.2 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Aus der Diskussion des gegenwärtigen Standes der Bildverarbeitung in der Elektronenmikroskopie lassen sich zusammenfassend folgende Aufgaben für eine on-line Bildanalyse am Transmissionselektronenmikroskop formulieren:

- es sollen durch eine Systemanalyse verschiedene fernsehtechnische Abtastsysteme verglichen werden um deren praktische Verwendbarkeit zu beurteilen
- es sollen Methoden zur Bildvorverarbeitung erprobt werden, um die Bildinformation in eine für die weitere Auswertung geeignete Form zu bringen
- durch eine Bildauswertung sollen strukturelle und elementare Eigenschaften biologischer Dünnschnitte unter den Bedingungen des Streuabsorptionskontrastes abgeschätzt werden.

Um zu versuchen, die verschiedenen Aufgaben der Bildanalyse zu systematisieren, wird ein informationstheoretischer Ansatz gewählt. Dieser übergeordnete Aspekt der Arbeit orientiert sich an den nachrichtentechnischen und kommunikativen Grundlagen der modernen Optik /Elias, 1953; Wiener, 1953; Linfoot, 1956, 1959, 1960 und Röhler, 1967/. Ein abbildendes System wird dabei als ein Nachrichtenübertragungssystem angesehen. Es besteht, wie Figur 2 zeigt, aus den drei Grundkomponenten Sender, Kanal und Empfänger. Für die digitale Bildanalyse am Elektronenmikroskop besteht das Signal in Form einer Elektronendichteverteilung und das Empfänger-signal in Form des digitalisierten Bildes. Der Kanal ist eine Übertragungskette mit verschiedenen Wandlungs-, Abbildungs- und Verstärkerstufen (siehe auch Fig.3). Das Signal kann bei der Übertragung verändert werden, indem es z.B. durch eine Übertragungsfunktion h bandbegrenzt oder durch additives Rauschen N gestört wird.

Die Tragfähigkeit des informationstheoretischen Ansatzes wird deutlich, wenn man die Bildanalyse als Erkennungsprozeß des Empfängers in das Modell der Nachrichtenübertragung integriert (Fig.2).

Der Systemanalyse kommt in der vorliegenden Arbeit zur Beschreibung des Übertragungskanals und zur Gestaltung und Steuerung der Bildverarbeitung eine zentrale Bedeutung zu. Die theoretischen Grundlagen zum Vergleich verschiedener fernsehtechnischer Abtastsysteme werden auf der Basis einer Übertragungskette in Kapitel III, die Ergebnisse der Messungen in Kapitel IV.2 der Arbeit beschrieben. Dabei stehen insbesondere die Analyse der Bandbegrenzung h durch Messung der Modulationsübertragungsfunktion (MTF) und Angaben zur Empfindlichkeit, z.B. bezüglich des äquivalenten Quantennutzeffektes (DQE), im Vordergrund.

In der Informationstheorie wird im allgemeinen von einer Auswahl oder Bedeutung der Nachricht abstrahiert, das heißt man betrachtet statistische Signalfolgen. Neben der Charakterisierung des Aufnahmesystems wird die Systemanalyse jedoch auch als Entscheidungskriterium für eine Bildvorverarbeitung und für die Kontrolle der Signalquelle zur Durchführung der Bildauswertung benutzt. Die Informationstheorie bietet dazu auf der Basis des Entropiebegriffes Maße an, die dem deterministischen Charakter des Untersuchungsobjektes Rechnung tragen (Kap.III.2).

In der Bildvorverarbeitung (Kapitel IV.3) wird insbesondere auf eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) und der Bildschärfe hingearbeitet. Hierzu besteht in Fig.2 eine Rückkopplungsschleife, die die Möglichkeit der Fokussierung als einen interaktiven Eingriff in den Übertragungskanal andeuten soll.

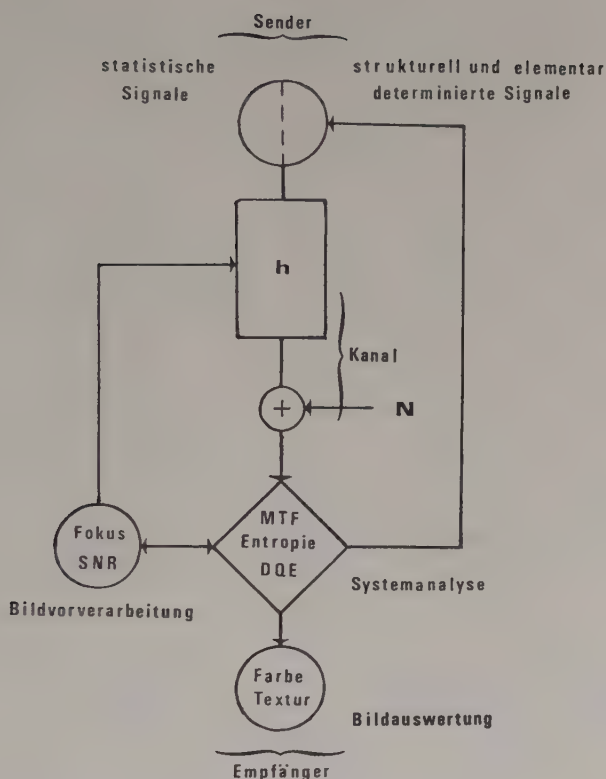


Fig.2 Bildanalyse unter dem Aspekt Informationstheorie

Die eigentliche Bildauswertung beinhaltet die Analyse determinierter Signale des Untersuchungsobjektes. Strukturelle Parameter werden in Kapitel IV.4 durch eine Texturanalyse, elementare Parameter in Kapitel IV.5 durch eine Farbanalyse bewertet. Zur Kontrolle des Senders wirkt in Figur 2 eine Rückkopplungsschleife auf den Sender. In der Arbeit wird dazu der von der Beschleunigungsspannung abhängige Streuabsorptionskontrast variiert. Die physikalischen Grundlagen der Kontrastentstehung werden im Kapitel III.1 beschrieben.

III. Theoretische Grundlagen zum Streuabsorptionskontrast und zur Bildanalyse

III.1 Der Streuabsorptionskontrast

Das im Transmissionselektronenmikroskop beobachtbare Bild wird je nach Abbildungsmodus eher durch den Streuabsorptionskontrast oder durch den Phasenkontrast repräsentiert. Im allgemeinen sinkt bei hohen Vergrößerungen der Streuabsorptionskontrast unter die Nachweisgrenze.

Neben der elastischen Wechselwirkung der Elektronen (kinetische Energie $E > 10 \text{ KeV}$) mit den Atomkernen, die zur Untersuchung der räumlichen Verteilung im Präparat genutzt wird, tritt eine inelastische Wechselwirkung der Strahlelektronen mit den Atomelektronen auf, die zur chemischen Identifizierung herangezogen werden kann. Obwohl bei der Abbildung biologischer Präparate nur ein geringer Bruchteil der Strahlelektronen absorbiert wird, beeinflussen die Wechselwirkungsmechanismen strahlenschädigend die atomaren und molekularen Strukturen, wobei die chemische Zersetzung und Kontamination des Materials zu Artefakten und Auflösungsverlusten bei der Strukturaufklärung führen kann /Hobbs, 1984; Reimer, 1984/.

Elektronen mit einer Beschleunigungsspannung U in Elektronenvolt kann nach einer Theorie von De Broglie (1924) eine Wellenlänge λ zugeordnet werden, abgeschätzt durch /Agar et al. 1974/:

$$\lambda [\text{nm}] = 0.1 \sqrt{\frac{150}{U}} \quad . \quad (1)$$

Im Hellfeld hält eine Blende (Kontrastblende) in der Fokusebene des Objektivs alle diejenigen Elektronen zurück, die in Winkel größer als die Objektapertur a_0 gestreut werden. Dieser Streuabsorptionskontrast wird bei amorphen, kontrastierten biologischen Dünnschnitten im unteren Vergrößerungsbereich ausgenutzt. Kontraständerungen sind auf Variationen in der Massendickenverteilung aus Präparatdicke und Dichte zurückzuführen.

Zur Berechnung des Bruchteils der Elektronen, die durch die Aperturblende zurückgehalten werden, ist der Wirkungsquerschnitt notwendig. Er kann aus der Rutherford'schen Näherung für Streuprozesse abgeleitet werden und durch quantenmechanische Atommodelle nach Born und Wentzel ergänzt werden /Reimer, 1984/. Dazu ist neben der Ordnungszahl Z der Bohrsche Atomradius $a_H(0.0569 \text{ nm})$, eine Approximation des Atomdurchmessers $R=a_H Z^{-1/3}$, eine relativistische Korrektur der Elektronenenergie $(1+E/E_0)$ und ein elementabhängiger Streuwinkel θ_0 notwendig. Der elastische Streuquerschnitt ergibt sich damit zu /Reimer, 1984/:

$$\sigma_{el} (a) = \frac{Z^2 R^2 (1+E/E_0)^2}{\pi a_H^2} \cdot \frac{1}{1 + (a/\theta_0)^2} \quad (2)$$

Entsprechend ergibt sich der inelastische Streuquerschnitt zu :

$$\sigma_{in} (a) = \frac{4Z^2 R^2 (1+E/E_0)^2}{\pi a_H^2} \cdot \left[\frac{-1}{4(1 + (a/\theta_0)^2)} + \ln \sqrt{1 + (a/\theta_0)^2} \right] \quad (3)$$

Der wesentliche Unterschied in beiden Gleichungen ist die Z -Abhängigkeit. Zur Abschätzung des Verhältnisses r der Anzahl der inelastisch gestreuten Elektronen zur Anzahl der elastisch gestreuten Elektronen ist nach Lenz /1954/:

$$r_{inel/el} \approx \frac{20}{Z} \quad (4)$$

Die Anzahl der inelastisch gestreuten Elektronen übersteigt die Anzahl der elastisch gestreuten nur für Elemente mit niedriger Ordnungszahl.

Das Verhältnis der durch die Aperturblende absorbierten Strahlelektronen zur Gesamtanzahl ist in Beziehung zur Massendicke mx :

$$\frac{dn}{n} = - \frac{N}{A} \left[\sigma_{el} (a) + \sigma_{in} (a) \right] dx \quad (5)$$

mit dem Atomgewicht A und der Avogadrokonstante N_A als Ausdruck für die Anzahl der Atome pro Gramm. Durch Integration findet man:

$$\ln n = - N \int_0^x \sigma \cdot mx + \ln n_0 \quad (6)$$

$$n = n_0 \exp (-N \int_0^x \sigma \cdot mx) .$$

Die Integrationskonstante n_0 legt die Anzahl der einfallenden Elektronen fest. Es zeigt sich eine exponentielle Abnahme, d.h. ein steigender Kontrast, bei linear zunehmender Massendicke. Diese Tatsache nutzt das Wägungsverfahren nach Zeitler und Bahr /1959, 1962/.

Während der inelastische Streuprozess weniger lokalisiert ist als der elastische, ist die Messung der inelastischen Energieverluste für viele quantitative Anwendungen von Bedeutung.

Die inelastische Wechselwirkung kann differenziert werden in 1) Ionisierung von Hüllelektronen (ursächlich für die charakteristische Röntgenstrahlung, $E' > 100$ eV), 2) Ionisierung von Valenzelektronen und Aufbrechen kovalenter Bindungen ($E' \approx 10-20$ eV), 3) Anhebung von Valenzelektronen in Leitungsbändern ($E' \approx 5-10$ eV) und 4) kollektive Anhebung schwach gebundener Valenzelektronen zu langwelligen Oszillationen (Plasmons, $E' \approx 25$ eV). Diese Variationen charakterisieren auch das Elektronenenergieverlustspektrum / Egerton, 1983 /.

III.2 Das Bilderfassungssystem als Übertragungskette

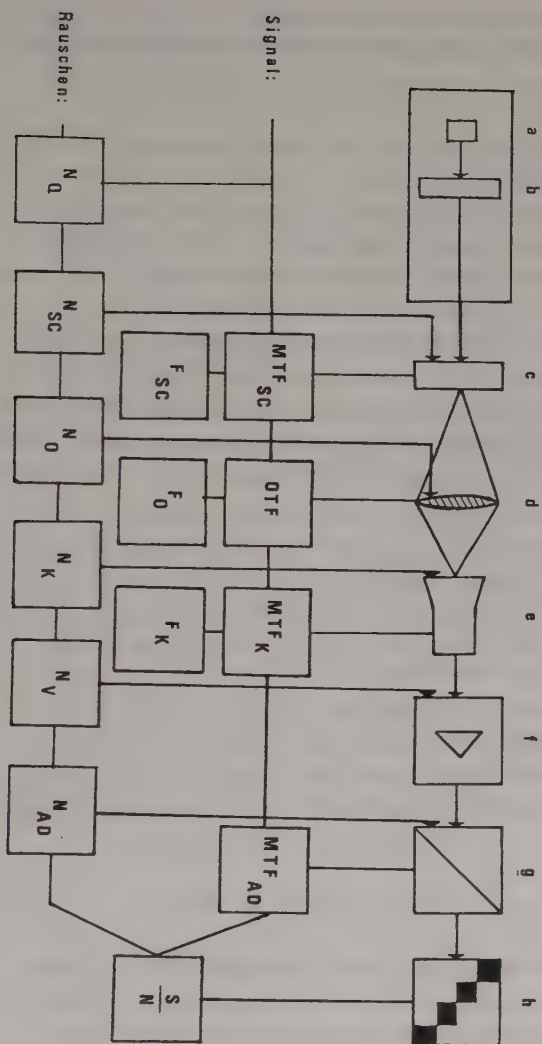
An einem Elektronenbild-Registriersystem finden zwischen dem Endbild des Elektronenmikroskops und dem im Rechner digital abgespeicherten Bild eine Reihe verschiedener Abbildungs-, Wandlungs- und Verstärkungsprozesse statt. Diese Vorgänge können aus physikalischer, technischer und informationstheoretischer Sicht berechnet und aufeinander abgestimmt werden. Obwohl, wie später beschrieben, verschiedene Wege zur technischen Realisierung eines Bildregistriersystems offenstehen, kann der prinzipielle Aufbau wie in Abbildung 3 als Übertragungskette beschrieben werden. Ähnliche Abbildungsketten sind in der Röntgentechnik diskutiert worden /Stieve, 1966; Frieser, 1975/.

Dabei entspricht dem Signaleingang die Elektronendichteverteilung im Endbild des Mikroskops und dem Signalausgang das digital gespeicherte Bild. Bei dem Übertragungsprozess wird das zweidimensionale Signal S nicht nur durch die Übertragungsfunktion bandbegrenzt, sondern auch durch verschiedene Störungen beeinflusst. Die Kathode (a) des Elektronenmikroskops emittiert einzelne Elektronen mit einer Schwankung (Varianz), die dem Mittelwert der gezählten Impulse gleich ist (Poisson-Statistik). Zur Wandlung der durch das Präparat (b) modulierten Elektronendichteverteilung in eine für TV-Kameras sensitive Strahlungsform ist ein Leuchtschirm (c, Szintillator) notwendig. Er begrenzt durch seine körnige Struktur das Auflösungsvermögen (MTF_{SC}) und liefert durch den Wandlungsprozeß der Elektronen in Photonen einen zusätzlichen Rauschbeitrag (N_{SC}). Mittels einer Optik (d, Tandem-Optik oder Faserplatte) wird das Photonenbild des Schirmes auf das Kameratarget abgebildet. Dabei begrenzt die Übertragungsfunktion der Optik (OTF), ebenso wie die der TV-Kamera (e) als fernsehtechnischer Detektor (MTF_K), das Auflösungsvermögen und die Kontrastübertragung des Gesamtsystems. Nach elektronischer Verstärkung (f) und analog-digitaler Wandlung (g) kann das Bild im Rechner abgespeichert werden.

In der TV-Kamera tritt zusätzliches Rauschen (N_K) bei den fotoelektronisch erzeugten Ladungsträgern und den Signalströmen auf, welches einerseits auf thermische Ladungsträgerbewegungen und andererseits auf statistische Stromschwankungen (Schrotrauschen) zurückzuführen ist. Weitere Rauscheinflüsse sind das Verstärkerrauschen (N_V) und das Quantisierungsrauschen des Analog-Digital-Wandlers (N_{AD}). Zusätzlich zum statistischen Rauschen sind im gespeicherten Bild ortsfeste Störungen festzustellen. Diese entstehen durch die Körnung des Leuchtschirmes und durch eine ortsabhängige Empfindlichkeit der Fernsehröhre (Shading). Diese Störungen werden als spektrale Funktionen F_{SC} , F_O und F_K multiplikativ mit den entsprechenden Übertragungsfunktionen von Szintillator, Optik und Kamera beschrieben (siehe Fig.3).

Die aufgeführten Faktoren bestimmen das Signal-Rausch-Verhältnis, den ortsfrequenzabhängigen Kontrastverlauf und das Auflösungsvermögen im gespeicherten Bild. Es sollen zunächst die informationstheoretischen Grundlagen einer solchen Abbildungskette dargestellt werden.

Fig.3 Darstellung der TV-Bilderfassung am Elektronenmikroskop als Übertragungskette mit den Systemkomponenten: Elektronenmikroskop (a), Objekt (b), Szintillator (c), Optik (d), TV-Kamera (e), Verstärker (f) und analog-digital-Wandler (g). Der Signal-Rausch-Abstand im digitalisierten Endbild wird durch die Übertragungsfunktion (MTF) der abbildenden Komponenten, deren ortsfesten Störungen (F) und additiven Rauscheinflüssen (N) bestimmt



III.3 Die Modulationsübertragungsfunktion

Unter der Annahme, daß die Abbildung im Elektronenmikroskop bis auf den Bereich nahe der Auflösungsgrenze ideal ist, wird die Auflösung des Gesamtsystemes durch das Bildregistriersystem begrenzt. Zur Charakterisierung des Auflösungs- und Kontrastwiedergabevermögens wird das Konzept der Modulationsübertragungsfunktion (MTF) genutzt. Die MTF beschreibt die Dämpfung der Intensitätsmodulationen im Ortsfrequenzspektrum gegenüber der auf 1 normierten Nullfrequenz (u_0). Der Kontrast C ist als Modulationskontrast mit dem minimalen und maximalen Wert einer angenommenen sinusodialen Intensitätsverteilung definiert:

$$C = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (11)$$

Die Abbildung in den einzelnen Stufen eines Bildregistriersystemes sei inkohärent; die Intensitäten sind dann stets reell und positiv. Weiterhin wird davon ausgegangen, daß die Intensitäten eines Punktes in der Objektebene $o(x,y)$ linear in ein Intensitätsbild $b(x,y)$ überführt werden. Die Punktantwort ist durch das Betragsquadrat der kohärenten Punktantwort $p(x,y)$ gegeben. Das Bild kann dann nach Born /1980/ durch ein Faltungsintegral beschrieben werden:

$$b(x,y) = D \iint b_1(x',y') |p(x-x', y-y')|^2 dx dy \quad (12)$$

Bei idealer, geometrischer Abbildung $o(x,y)$ ergibt sich die ideale Bildfunktion $b_1(x,y)$; bei einer Vergrößerung M ist $x'=Mx$ und $y'=My$. Die Konstante D beschreibt eine konstante Dämpfung oder Verstärkung der Intensitäten durch den Abbildungsprozeß.

Bei beugungsbegrenzten Systemen wird die Punktantwort im wesentlichen durch die Aperturfunktion bestimmt und ergibt sich durch Fraunhofer Beugung zu einem rotationssymmetrischen Muster, das als Airy-Funktion mit der Besselfunktion 1. Ordnung zu beschreiben ist /Born, 1980/. Hieraus leitet sich das Rayleigh-Auflösungskriterium ab.

Die auflösbare Grenzfrequenz kann auch direkt aus dem Faltungsintegral bestimmt werden. Die Fouriertransformierte der Bildfunktion der Punktantwort h ist:

$$B(u, v) = \int_i B_i(u, v) \mathcal{F}\{|h|^2\} \quad (13)$$

Normiert man die Spektren auf die Werte bei $u, v=0$, so ergibt sich Definition der Modulationsübertragungsfunktion (MTF), als optische Übertragungsfunktion (OTF) zu:

$$MTF(OTF) = \frac{\mathcal{F}\{|h|^2\}}{\mathcal{F}\{|h|^2\}_{u=0, v=0}} \quad (14)$$

Die Modulationsübertragungsfunktion läßt sich im Ortsfrequenzbereich bestimmen. Dazu bietet man dem System ein Punkt-, Linien- oder Kantenbild an und bestimmt nach Fouriertransformation des aufgenommenen Bildes die MTF. Dies setzt voraus, daß die Abtastfrequenz u mindestens doppelt so groß ist wie die zu erwartende Bandbreite des Systemes. Diese wird durch die Digitalisierung des analogen Kamerasignales auf 512×512 Bildpunkten festgelegt.

Unter der Annahme einer rotationssymmetrischen Übertragungsfunktion ist die Bestimmung der MTF aus der Kantenfunktion am einfachsten. Die Kante ist definiert durch:

$$b(x,y) = k(x) = \begin{cases} 0 & x < 0 \\ 0.5 & x = 0 \\ 1 & x > 0 \end{cases} \quad (15)$$

Die Signalantwort $k(x)$ kann durch Differenzieren in x -Richtung auf eine Linienantwort $l(x)$ zurückgeführt werden mit

$$l(x) = \frac{d}{dx} k(x) \quad (16)$$

Hieraus kann die Übertragungsfunktion bestimmt werden mit

$$H(u,v) = \mathbf{F} \left\{ \frac{d}{dx} k'(x) \right\} = \mathbf{F} \left\{ l(x) \right\} = L(u) \quad (17)$$

Zur Reduktion des Rauschanteils, der die Impulsantwort des Systems verfälscht, läßt sich durch n Abtastzyklen eine Mittelung durchführen, wobei sich bei Normalverteilung der Amplitudenschwankungen eine Reduzierung des Rauschanteils um $\sqrt{n}$ ergibt.

An abbildenden Detektoren hoher Quantenempfindlichkeit kann die MTF auch durch Bestimmung des Rauschleistungsspektrums erfolgen. Diese Methodik ist von Rossmann /1967 a,b/ für das Gebiet der Röntgentechnik vorgeschlagen worden und wird hier auf die elektronenmikroskopische Problemstellung übertragen. Es wird davon ausgegangen, daß die Quanten im Endbild des Elektronenmikroskopes als weißes Rauschen ein Rauschleistungsspektrum $W(u,v)$ ergeben mit

$$W(u,v) = \iint C(x,y) e^{-2\pi i (ux+vy)} dx dy \quad (18)$$

und mit der Autokorrelationsfunktion

$$C(x,y) = \int_{-x/2}^{x/2} \int_{-y/2}^{y/2} b(x',y') b(x'+x,y'+y) dx' dy' \quad (19)$$

Durch den bandberendenden Abbildungsprozeß werden die diskreten Quantenimpulse als "Quantum Mottles" wahrgenommen (siehe auch Fig. 1e). Der Betrag der Übertragungsfunktion $T(u,v)$ läßt sich damit aus dem gemessenen Wienerspektrum $W(u,v)$ bestimmen

$$W'(u,v) = W(u,v) \cdot |T(u,v)|^2 \quad (20)$$

III.4 Das Elektronenrauschen und die DQE

Das im Endbild des Elektronenmikroskops auftretende Elektronenrauschen wird durch die Poisson-Statistik beschrieben:

$$P(\bar{N}, N) = \frac{\bar{N}^N e^{-\bar{N}}}{N!} \quad (21)$$

Hierbei ist $\bar{N}$ die im Mittel eintreffende Elektronenzahl und N die tatsächlich eintreffende Anzahl. Die Poissonstatistik hat die Eigenschaft $\text{VAR}(N) = \bar{N}$, wodurch eine Ladungsverteilung q im Endbild durch eine Granulation überdeckt wird. Der Kontrast wird hier im Vergleich zu Gleichung 11 definiert als:

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\min}} = dq/q \quad (22)$$

Ein Kontrast bedarf zur Detektion einer Anzahl von Elektronen $s^2 dq/e$, wobei e die Elementarladung des Elektrons und s^2 die Fläche eines Bildelements darstellt. Es ergibt sich die Ungleichung, wenn die Standardabweichung kleiner als der Kontrastunterschied sein soll:

$$\left(\frac{s \cdot q}{e} \right)^{0.5} < \frac{s \cdot dq}{e} \quad (23)$$

Aus dem Gebiet der psychologischen Optik konnte für Schwellenwertbeobachtung an Kreisscheiben ein das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmender Faktor $k=5$ ermittelt werden /Rose, 1948/. Hieraus ergibt sich die unter dem Begriff der Rose-Gleichung geführte Beziehung:

$$\frac{q}{e} = \left(\frac{5}{s \cdot K} \right)^2 \quad \text{oder} \quad s = \frac{5}{K} \left(\frac{e}{q} \right)^{0.5} \quad (24)$$

Diese Gleichung zeigt die zur Detektion eines kleinen Objektdetails im Nanometerbereich notwendige hohe Stromdichte von etwa 10^2 - 10^4 Elektronen pro Quadratnanometer.

Die Rose-Gleichung zur visuellen Detailerkennbarkeit geht von der Annahme eines Systemes aus, welches jedes Elektron mit gleichem Gewicht und ohne zusätzliche Rauscheinflüsse detektiert. Reale Detektorsysteme weichen mehr oder minder von dieser Voraussetzung ab. Dies ist auf zusätzliche signalunabhängige Rauschquellen und auf eine statistisch schwankende Signalhöhe der durch Elektronen ausgelösten Impulse zurückzuführen.

Durch N Elektronen kann innerhalb einer Bildfläche, deren Größe oberhalb des Auflösungsvermögens des Systemes liegt, ein Signal S beobachtet werden /Herrmann, 1984/:

$$S = \bar{N} \cdot \bar{h} \quad . \quad (25)$$

Dabei ist $\bar{h}$ der Mittelwert der auftretenden Impulshöhen. Diese Größe hängt von der Quantenausbeute c der Elektron - Foton / Foton - Elektron Wandlungsprozesse des Gesamtsystemes ab mit der Quantenausbeute von Szintillator c_S , Optik c_O , Kameraeingangsschirm c_P und der Kamera c_K :

$$\bar{h} = c_{tot} = c_S \cdot c_O \cdot c_P \cdot c_K \quad . \quad (26)$$

Zur Abschätzung der Rauscheinflüsse ist die Varianz des Signales S durch die Anwendung des Varianztheorems nach Mandel /1959/:

$$\text{Var } S = c^2 \text{ Var } N + \bar{N} \text{ Var } c = \bar{N} (\bar{h}^2 + \text{Var } h) \quad . \quad (27)$$

Für das Quadrat des Signal-Rausch-Verhältnisses gilt demnach:

$$\frac{\bar{S}^2}{\text{Var } S} = \frac{\bar{N}}{1 + \frac{\text{Var } h}{\bar{h}^2}} \quad . \quad (28)$$

Aus der rekursiven Anwendung des Varianztheorems erhält man für den mehrstufigen Quantenwandlungsprozess ein Signal-Rausch-Verhältnis von:

$$\frac{\text{Var } h}{\bar{h}^2} = \frac{\text{Var } c_S}{\bar{c}_S^2} + \frac{\text{Var } c_O}{\bar{c}_S \bar{c}_O^2} + \frac{\text{Var } c_K}{\bar{c}_S \bar{c}_O \bar{c}_K^2} \quad (29)$$

An dieser Formel ist die Bedeutung der ersten Wandlungsstufe erkennbar.

Die Abweichung vom idealen System wird durch den Begriff des äquivalenten Quantennutzeffektes (Detectiv Quantum Efficiency, DQE) beschrieben. Die DQE ist definiert durch:

$$DQE = \gamma \frac{\text{Var } S_{in}}{\text{Var } S_{out}} \quad (30)$$

mit dem Eingangssignal S_{in} und dem Ausgangssignal S_{out} . Die Gradation des Systems, dS_{out}/dS_{in} , ist im Fall des linearen Systems $\gamma = S_{out}/S_{in}$. Mit dem Signal-Rausch-Verhältnis ergibt sich dann die Beziehung:

$$DQE = \frac{\text{SNR}_{out}^2}{\text{SNR}_{in}^2} \quad (31)$$

Abwandlungen dieser Formel berücksichtigen instrumentelle Parameter wie die Abhängigkeit der DQE von Stromdichte und der Impulshöhenverteilung /Herrmann, 1984/.

III.5 Die Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik

Die Bestimmung einer Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik erlaubt neben dem direkten Vergleich verschiedener Detektorsysteme die gezielte Ausnutzung der Systemeigenschaften bei Vermeidung unnötiger Strahlenbelastung des Präparates.

Die erste Charakteristik dieser Art ist von Hobbs /1984/ für die visuelle Beobachtung auf der Basis der Rose-Gleichung ermittelt worden. Sie zeigt, daß für eine vorgegebene Elektronendichte eine optimale Vergrößerung M^* existiert. Eine zu starke Vergrößerung kann zu einem Verlust an Auflösung führen, da sich die Schärfewahrnehmung des Auges mit abnehmender Leuchtdichte des Leuchtschirmes verringert /Boseck, 1980/.

Es ist von Interesse, die Charakteristik auch für die visuelle Wahrnehmung mit technischen Hilfsmitteln (Detektoren) zu berechnen. Um das Übertragungsverhalten des abbildenden Systems zu berücksichtigen, wird die Gleichung 24 zunächst durch die MTF erweitert. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der Kontrast in seiner Definition als Modulationskontrast nach Gleichung 11 anzuwenden ist. Die Abweichung vom Kontrast K nach Definition 22 ist jedoch bei den hier interessierenden Schwellenwertbeobachtungen vernachlässigbar. Es ergibt sich das Auflösungsvermögen s zu:

$$s = \frac{k}{C \cdot MTF(u) \cdot t} \left(\frac{q}{e \cdot DQE} \right)^{0.5} \quad (32)$$

Da die Poissonstatistik in Verbindung mit Gleichung 24 zeigt, daß ein Detektionsproblem in linearer Beziehung zur DQE steht und zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses oft auf eine zeitliche Bildintegration t zurückgegriffen wird, ergibt sich:

$$s = \frac{k}{C \cdot MTF(u)} \left(\frac{e}{q} \right)^{0.5} \quad (33)$$

Mit einer Vergrößerungsangabe M und einem Skalierungsfaktor ergibt sich, mit der in der Elektronenmikroskopie üblichen Angabe der Elektronendichte in Elektronen pro Quadratmikrometer, das Auflösungsvermögen s in Nanometern:

$$s \text{ [nm]} = \frac{\sqrt{10^8} \cdot k}{20 \cdot M \cdot \text{MTF}(u) \cdot C \cdot t} \left(\frac{e}{\text{DQE} \cdot q} \right)^{0.5} \quad (34)$$

Eine ähnliche Beziehung ist auch für fotografische Schichten entwickelt worden /Frieser, 1975/.

IV. Material und Experiment

IV.1 Aufbau und Betrieb des Bilderfassungssystem

Die hier erprobten Systeme bestanden aus einer Kombination von Strahlelektron / Lichtfoton Wandlerstufe (Szintillator) und hochempfindlicher TV-Kamera, gekoppelt durch eine Optik. Im Einzelnen wurden drei verschiedene Konfigurationen an einem konventionellen Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 10 (Zeiss, Oberkochen) erprobt:

- 1) eine Tandem-Optik / Chalnicon-Kamera unterhalb der Mikroskopsäule (Zeiss/Spatial Data)
- 2) eine seitlich einschwenkbare Spiegelgruppe (Prisma) mit einer Tandem-Optik und einer Saticon-Röhre (Zeiss/Panasonic)
- 3) ein Faserplattenanschluß mit einer LLL-TV-Kamera. (Zeiss/Bosch).

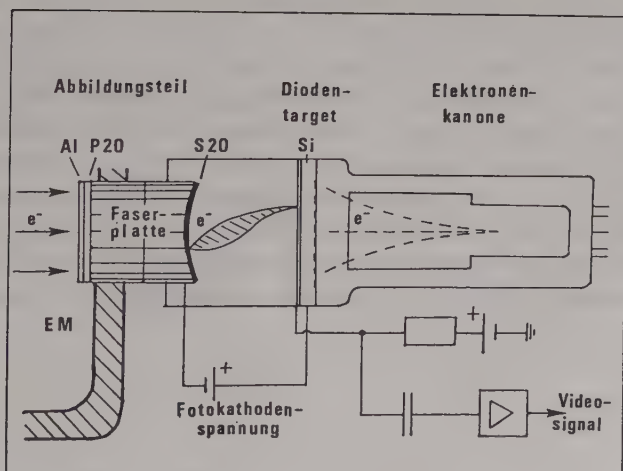
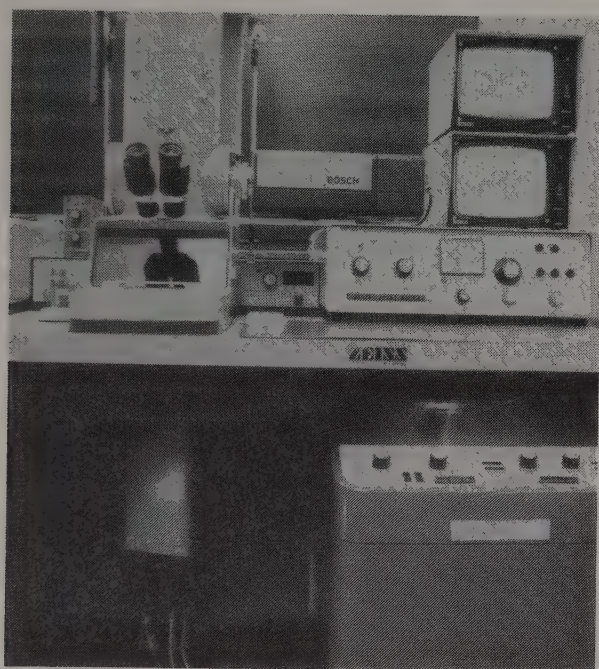
Nach analog-digitaler Wandlung des Videosignales mit einem 10-bit, 12.4 MHz ADC (Analog Devices, Norwood, MA) kamen als Bildspeicher die Random Access Memories (RAMs) eines Imageprozessor (Eyecom III, Spatial Data, Goleta, CA) um Einsatz. Dieser erlaubt eine Reihe von Bildoperationen in Echtzeit unter Kontrolle einer PDP 11/23 (Digital Equipment Corp., Maynard, MA) und ist über ein DMA-Interface mit einer VAX 11/750 (DEC) verbunden. Die hier abgespeicherten Bilder, mit einer Bildgröße von 512*640 Bildpunkten und einer Dynamik von 8 bit, wurden mit Fortran 77 analysiert und weiterverarbeitet. Zur Darstellung der bearbeiteten Bilder und für interaktive Arbeiten wurde ein Imageprozessor Comtal Vision one/20 (Comtal/3M, Pasadena, CA) eingesetzt.

An Elektronenbild-Erfassungssystemen, die durch Verwendung eines Bildverstärkers einzelne Elektronenimpulse detektieren, sind generell zwei unterschiedliche Betriebsarten möglich: Der Zählbetrieb (Single Electron Counting Mode) und der Analogbetrieb. Der Zählbetrieb wird angewandt, um bei hoher Empfindlichkeit eine gute Linearität auch bei geringen Leuchtdichten zu erreichen. Dazu kann eine Normalisierung dergestalt durchgeführt werden, daß der in einem Bereich registrierte Impuls auf einen Bildpunkt mit einer bestimmten Intensität reduziert wird. Dies ist nur durch eine aufwendige Elektronik zu erreichen, da die Impulse in der Regel auf mehrere TV-Zeilen und (bei langer Abklingzeit) auf sequentielle TV-Bilder verteilt sind. Ein Nachteil liegt in der auf etwa 10^{-12} A/cm² begrenzten Stromdichte, da zur Normalisierung ein gewisser Bild- und (Tot-)Zeitbereich um den interessierenden Impuls herum von weiter eintreffenden Impulsen freigehalten werden muß /Herrmann et al., 1982; Rust, 1982/.

Der in dieser Arbeit untersuchte Analogbetrieb entspricht dem normalen Betrieb von TV-Kameras, das Bild kann hierbei auf einem TV-Monitor betrachtet werden. Die zeitliche Integration der Ladungen wird dabei auf dem Target der Kamera und in dem Bildspeicher durchgeführt, der mit einem auf 16 bit ausgelegten Speicher (RAM) die Akkumulation von 256 einzelnen 8 bit Bildern zuläßt.

Fig.4 TV - Bilderfassungssystem am Transmissionselektronenmikroskop, bestehend aus einer seitlichen Konfiguration mit einschwenkbarer Spiegelgruppe und einem Faserplattenanschluß mit Restlichtverstärkerkamera unterhalb der Säule

*Fig.5 Schematischer Aufbau einer Low-Light-Level Kamera-
röhre (SIT) mit Faserplatteneingang, elektronenoptischem Abbildungsteil, Target und Elektronenkanone*



IV.2 Bestimmung der Systemeigenschaften

IV.2.1 Wandlungsprozesse im Bilderfassungssystem

Die erste Wandlungsstufe in der Abbildungskette stellt der Leuchtschirm (Szintillator) dar, der die Elektronendichteverteilung im TEM-Endbild in eine für eine TV-Kamera erfaßbare Fotonen- oder Leuchtdichteverteilung umwandelt. Es handelt sich dabei um Materialien wie ZnS/Ag (Handelsname P11), Cd/Ag (P 20) oder Y/Al, Si (P 47, X3). Die Anforderungen, die an einen solchen Schirm zu stellen sind, betreffen insbesondere eine hohe Fotonausbeute, eine kurze Abklingzeit, eine geeignete spektrale Empfindlichkeit und eine gute Ortsauflösung.

Zur Herstellung der Schirme wird feinkörniges Pulver (1-5 μm) auf eine Glas- oder Faserplatte aufsedimentiert und mit einem Kollodiumfilm und einer spiegelnden Metallschicht versehen. Dadurch sollen mehr Fotonen in Richtung Kamera gelenkt werden.

Ebehardt /1968/ hat die Fotonausbeute verschiedener Materialien gemessen und gibt für einen P 20 Schirm 0.06 Fotonen pro eV der Primärenergie an. Ein Elektron der Energie 100 KeV erzeugt demnach 6000 Fotonen, die Quantenausbeute beträgt $c_s = 6000$. Auf dem Kameraszintillator stellt sich hierbei eine Beleuchtungsstärke von $1.5 \cdot 10^{-4}$ Lux ein (SIT sensitiv bis etwa 10^{-5} Lux). Diese und weitere Eigenschaften der Szintillatoren sind vergleichend von Rust /1982/ gemessen worden. Daraus ergab sich für den P20 Leuchtschirm gegenüber anderen Materialien die relativ höchste Fotonausbeute; die spektrale und maximale Lichtintensität liegt mit 560 nm im Bereich der meisten Schwarzweiß-TV-Kameras. Die relativ lange Abklingzeit von 12 ms (von 90% auf 10%) macht sich jedoch bei Fernsehabtastung als ein Nachleuchteffekt bemerkbar.

Die kommerziell wichtigsten TV-Bildaufnehmeröhren arbeiten nach dem Vidikon-Prinzip. Durch die Verwendung neuartiger Targetmaterialien konnte die absolute und spektrale Empfindlichkeit der Röhren immer wieder verbessert werden, so daß Kameras des Typs Saticon mit einem Selen-Arsen-Tellur-Fotoleitermaterial bis zu einer Beleuchtungsstärke von wenigen Lux sensitiv sind.

Die höchste Lichtempfindlichkeit (10^{-3} - 10^{-5} Lux) besitzen Silicon Intensified Target (SIT)-Kameraröhren. Andere Bezeichnungen gleicher Bauart dieser LLL-TV-Kameraröhre sind EBS (Electron Bombardment Silicon) und EIC (Electron Induced Conductivity). Die Arbeitsweise dieser Kameras sei im folgenden kurz skizziert. Die Röhre besteht aus einem elektronenoptischen Abbildungsteil, dem Target und der Elektronenkanone (Fig.5). Das Licht trifft am Ende der Faserplatte auf die Fotokathode und löst dort durch den äußeren Fotoeffekt Fotoelektronen aus, die durch den elektronenoptischen Abbildungsteil in Richtung des Targets beschleunigt und abgebildet werden. Diese Targetfläche besteht aus einem dünnen n-leitenden Siliziumsubstrat, in dem rückseitig ca. 700000 p-leitende Inseln mosaikförmig eingelassen sind. Diese bilden als p-n Übergänge Dioden aus. Die hohe Sensitivität der Kamera ist durch die Ladungsmultiplikation innerhalb des Targets gegeben, wobei pro 3.6 eV Energieverlust der Fotoelektronen ein Elektron / Lochpaar erzeugt wird. Die Ladungslöcher diffundieren in die Dioden, worauf die p-n Übergänge sperren und somit gegenüber der angelegten Targetspannung wie Kondensatoren entladen bleiben. Ähnlich wie bei dem Vidikon-Prinzip tastet der Elektronenstrahl der Elektronenkanone das Target von der Diodenseite her ab und ergänzt die Ladungsdifferenz, woraus sich das dem Videoverstärker zugeführte Signal ergibt. Durch Variation der Fotokathodenspannung kann die Empfindlichkeit der Röhre in weiten Grenzen geregelt werden /Eccles et al., 1983/. Die vertikale Abtastung erfolgt nach dem Zeilensprungverfahren (wobei die Abtastdauer einer Fernsehzeile 52 Mikrosekunden in Anspruch nimmt) und entspricht mit 50 Halbbildern pro Sekunde der Fernsehnorm.

Die Wandlung der Photonen in Kamera-Fotoelektronen ist ein verlustreicher Prozeß, für den standardmäßigen P 20 Schirm ergibt sich eine Quantenausbeute c_p von 0.1-0.2. Zwischen dem Szintillator und dem Kameraeingang muß aus Gründen des Signal-/Rausch-Verhältnisses deshalb eine möglichst absorptionsfreie Übertragung angestrebt werden. Bei der Benutzung einer Tandemoptik kann davon ausgegangen werden, das sich in Abhängigkeit von den Glas-/Luftflächen c_0 zu etwa 0.01-0.001 ergibt. Die Verwendung eines Faserplattenanschlusses mit der theoretischen Apertur 1 und dem Verzicht auf eine vakuumabdichtenden Szintillatorträgerplatte ergibt eine Quantenausbeute zwischen 0.1 und 0.5.

Der Wirkungsgrad der Kameras selbst variiert je nach technischem Aufbau und den ablaufenden physikalischen Prozessen. Für eine typische Vidikonkamera kann man eine Quantenausbeute von etwa $c_k=0.1-0.2$ erwarten, mit einer Saticon - Röhre kann man Werte um 0.5 erreichen. Kameras die für LLL - TV ausgelegt sind haben als Typ Silicon Intensified Target ein $c_k=10^3-10^4$, einstufige Restlichtverstärkerkameras ein c_k bis zu 10^3 .

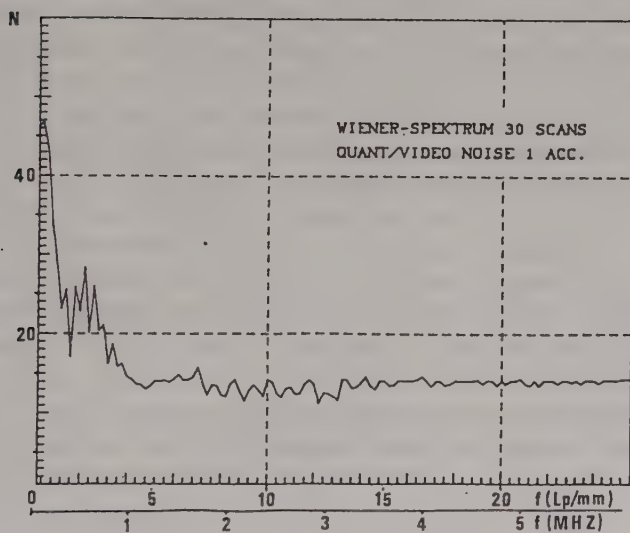
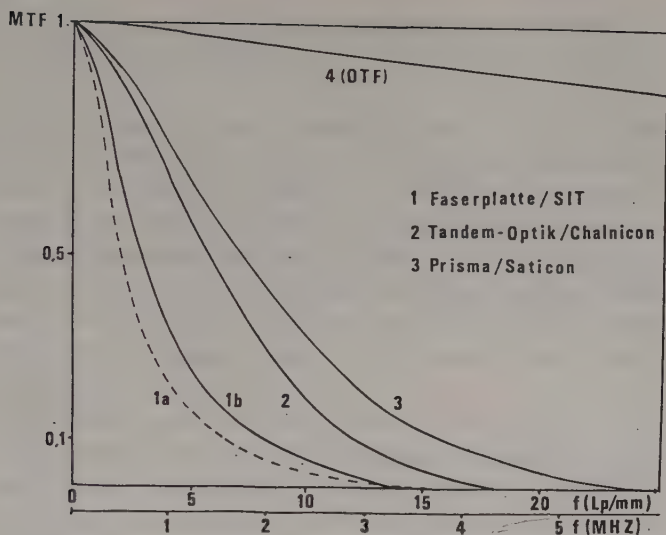
Die gesamte Quantenausbeute läßt sich damit aus der Multiplikation der Einzelwerte des Szintillators, der Optik, dem Kameraeingangsschirm und der Kamera nach Formel 26 bestimmen. Dabei ergibt sich als Abschätzung für die Tandem-Optik/Vidicon Konfiguration ein c_{tot} von etwa 10, für den Faserplatten/SIT Aufbau ein c_{tot} von etwa 10^4 . Die Quantenausbeute bestimmt maßgeblich die Intensitätsübertragungsfunktion und Rauscheinflüsse des Systems (siehe Kapitel IV.2.3).

Die Darstellung Fig. 6 zeigt die Übertragungsfunktionen der getesteten Systeme, die aus den Formeln 15 bis 17 durch Einführung einer Blende in den Strahlengang des Elektronenmikroskops ermittelt werden. Die MTF's beschreiben die Bandbegrenzung durch Leuchtschirm, Optik und Kamera gemäß der Übertragungskette in Abbildung 3, wobei nach dem Multiplikationstheorem /Röhler, 1967/ die MTF's der Einzelkomponenten multiplikativ verknüpft sind. Die Umwandlung der Ortsfrequenz in die Frequenz des Videosignals kann über die Zeit $t=52 \mu\text{s}$ erfolgen. Dies ist die Zeit, die der Abtaststrahl braucht, um die Targetbreite von 12.8 mm zu überstreichen. Der Vergleich mit der OTF eines Kleinbildobjektivs (1:2) zeigt einen nur geringen Beitrag zur Bandbegrenzung.

Zur Berechnung des Wienerspektrums wurde ein modifiziertes Programmpaket benutzt /IEEE, 1979/. Zur besseren Verdeutlichung werden die Spektren im linearen Maßstab wiedergegeben und nicht wie sonst üblich logarithmisch. Das in eindimensionaler Form vorliegende Programm zeigt wenig reproduzierbare Ergebnisse, eine Mittelung von 30 Bildzeilen dagegen ein statistisch signifikanteres Ergebnis. Die Abbildung 7 stellt das Wienerspektrum der LLL-TV-Kamerakonfiguration dar, die Bandbegrenzung durch die MTF ist nach Formel 20 direkt aus dem Spektrum ablesbar. Der Vergleich mit der aus der Kante ermittelten MTF zeigt eine stärkere Bandbegrenzung. Dies dürfte, da die Messung bei einer niedrigeren Stromdichte vorgenommen wurde (10^{-12} A/cm^2), auf den für SIT-Kameras typischen Blooming-Effekt zurückzuführen sein /Euro-Atlas, 1978/.

Fig.6 Die MTF für verschiedene TV-Bilderfassungssysteme am TEM, ermittelt aus der Abbildung einer Blendenkante. Die MTF der LLL-TV-Kamera (1a) wird auch aus dem Wienerspektrum bestimmt (1b)

Fig.7 Das Wienerspektrum, ermittelt aus dreißig Bildzeilen, zeigt den typischen Verlauf der MTF der LLL-TV-Kamera, der sich bei Abbildung von Einzelimpulsen der Strahlerelektronen ergibt



IV.2.3 Die Messung der Intensitätsübertragungsfunktion

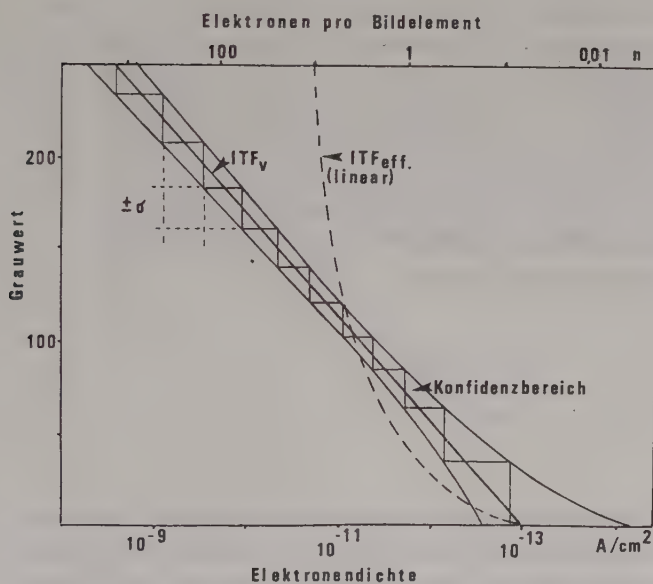
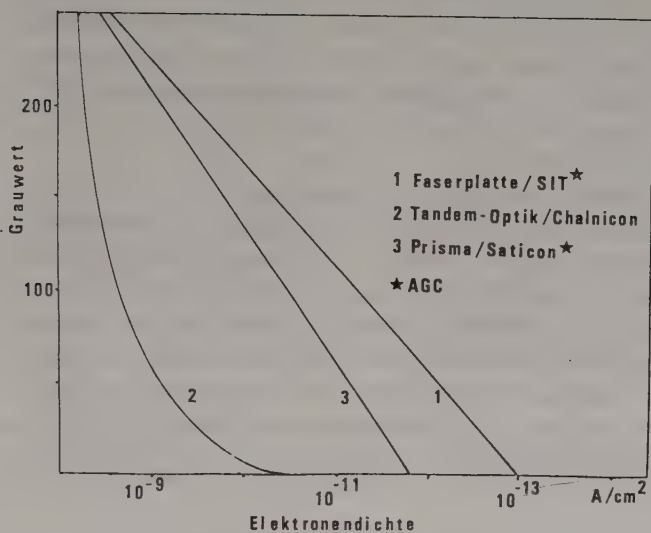
Die Bestimmung der Intensitätsübertragungsfunktion (ITF) zeigt, ob ein linearer Zusammenhang zwischen Eingangs- und Ausgangssignal gegeben ist oder über welche Funktion beide verknüpft sind. Die ITF beschreibt für das im Analogbetrieb arbeitende Bilderfassungssystem am TEM die Übertragungscharakteristik für eine konstante mittlere Elektronendichteverteilung als Funktion der erfaßten Meßgröße, d. h. dem Grauwert im digitalisierten Bild. Für ein lineares System muß das Superpositionsprinzip gelten /Röhler, 1967/.

Zur Messung der Elektronendichteverteilung im Endbild des TEMs kann die Belichtungsautomatik herangezogen werden, die bei entsprechender Eichung einen Faradayschen Käfig ersetzt. Fig.8 zeigt die Abhängigkeit der Elektronendichte von dem digitalisierten Grauwert für die erprobten Kameraadapterkonfigurationen. Dabei wurde ein mittlerer Grauwert aus dem Histogramm genutzt und bei starkem Rauschen zusätzlich Akkumulationsroutinen verwandt. Aus der logarithmischen Darstellung der Elektronendichte zeigt sich für die Tandem-Optik/Chalniconkamera ein lineares Verhalten. Die beiden anderen Konfigurationen besitzen eine automatische Kameraverstärkerregelung (Automatic Gain Control, AGC), wobei die mittlere Intensität auf dem Kameratarget den Verstärkungsgrad bestimmt (Mittenwertregelung).

Diese Besonderheit bietet für die visuelle Beobachtung am Monitor, für eine möglichst präparatschonende Einregelung der Elektronenstrahldichte und für eine gute Ausnutzung des Dynamikbereiches Vorteile. Jedoch muß bei quantitativen Messungen, insbesondere bei Vergleich des Kontrastes, diese Eigenschaft unbedingt Berücksichtigung finden. Neben der mechanischen Abschaltung dieser Regelung kann die auftretende Nichtlinearität durch Kenntnis der genauen funktionellen Zusammenhänge später im Rechner korrigiert werden.

Fig. 8 Die Intensitätsübertragungsfunktion (ITF) verschiedener TEM / TV - Bilderfassungssysteme zeigt den Zusammenhang zwischen einem Eingangssignal, gegeben durch die Elektronendichte im TEM-Endbild, und Ausgangssignal, dem Grauwert im digitalisierten Bild

Fig. 9 Die ITF der Restlichtverstärkerkamera zeigt eine Verstärkerkennlinie (ITF v) durch die automatischer Verstärkerregelung für ein mittleres Eingangssignal und eine lineare Kennlinie (ITF e_{ff}) für die bildabhängigen Schwankungen in der Elektronendichte. Der Konfidenzbe- reich, ermittelt aus der Streuung der Signalamplitude, zeigt die Anzahl der auflösbaren Intensitätsstufen



Da, wie oben beschrieben, durch eine automatische Verstärkerkontrolle ein großer Intensitätsbereich überdeckt wird, kann bei es bei einer Linearisierung der Bilder zu Dynamikproblemen kommen, die durch eine Verringerung der Grauwertaussteuerung auf einen Bereich von 7 bit umgangen werden können.

Durch Messung der Grauwerte eines Bildes mit großflächigen Kontrasten konnte unter Variation der mittleren Elektronendichte im Endbild nachgewiesen werden, daß die Nichtlinearität der ITF nicht auf die relativen Kontrastunterschiede im jeweiligen Bild zu beziehen ist. Die Kamera arbeitet durch die Mittenwertregelung des Verstärkers nur in Hinsicht auf den jeweils mittleren Grauwert des Gesamtbildes nichtlinear. Die Intensitätsübertragungsfunktion läßt sich so in eine dem Verstärker zugeordnete Funktion (ITF_v) und in ein effektives Kennlinienfeld (ITF_{eff}) aufteilen (Fig. 9).

Die Beziehungen zwischen einem mittleren Grauwert G und der Elektronendichte N in Elektronen pro Bildelement ergibt:

$$G = \frac{e^{N/30}}{10} \quad . \quad (35)$$

Durch Umkehrung läßt sich hieraus die zur Linearisierung notwendige Funktion ableiten:

$$G_{korr} = e^{G/30} \cdot 2.5 \quad . \quad (36)$$

Die ITF bestimmt u.a. die Temperaturbelastung des Präparates. Unter Verwendung der Formeln A.1 und A.2 im Anhang ist in Fig.10 die Temperaturerhöhung für organischen Kohlenstoff in Abhängigkeit vom mittleren Grauwert berechnet. Die Beschleunigungsspannung ist zu 80 KV und die Vergrößerung zu 10000 fach angenommen.

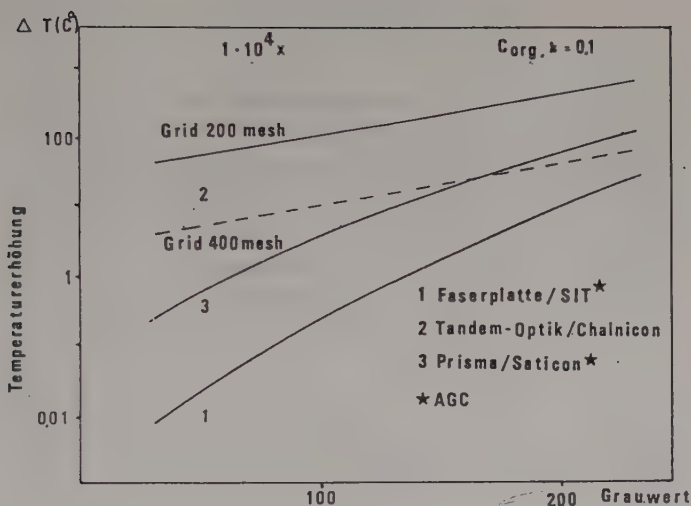


Fig.10 Abschätzung der Temperaturerhöhung organ. Kohlenstoffs für verschiedene Bilderfassungssysteme bei 10000facher Vergrößerung in Abhängigkeit vom Grauwert im digitalisierten Endbild. Mit der unempfindlichen Konfiguration aus Tandem-Optik und Chalnicon-Kamera tritt auch bei geringer Leuchtdichte ein nennenswerter Temperaturanstieg auf, der durch feinere Maschen eines temperaturableitenden Kupfernetzes nur unwesentlich verringert werden kann

IV.2.4 Messung des Rauschens im digitalen Bereich

Für die folgenden Überlegungen wird davon ausgegangen, daß die Schwankungen der Abtastamplituden $s(x,y)$ eines Bildes $b(x,y)$ in einem Bereich mehrerer Bildpunkte normalverteilt, systematische Störeinflüsse (z.B. Shading) werden ausgeschlossen. Die Varianz ist durch den Erwartungswert der quadratischen Abweichung definiert, der sich bei genügend großer Stichprobenzahl aus der mittleren quadratischen Abweichung ergibt und die gesamte Rauschleistung des Systems repräsentiert.

Die Varianz wurde in einem zentralen Bildbereich von 100×100 Bildpunkten aus Histogrammen bestimmt. Für die LLL-TV-Kamera ist hieraus die Streuung in Fig. 9 angegeben, mit der die Signalamplitude der Intensitätsübertragungsfunktion mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% schwankt. Hiermit ist der Konfidenzbereich definiert, in den 68% der Meßwerte fallen.

Die senkrechte Breite des Bereiches definiert den im jeweiligen Arbeitspunkt nötigen Signalhub, die zugehörige waagerechte Breite die erforderliche Intensitätsdifferenz, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,68 ein Signal-Störampplitudenverhältnis größer als 1 zu erreichen. Paßt man dem Konfidenzbereich eine Treppenfunktion an, so ist die Anzahl der auflösbaren Signal- und Intensitätsstufen näherungsweise durch die Anzahl der Stufen gegeben. Es zeigt sich aus Fig. 9, daß mit dem LLL-TV-System 11 Graustufen (etwa 4 bit) aufgelöst werden können.

Das Signal-Rausch-Verhältnis ergibt sich als Leistungsverhältnis aus dem Quadrat der Abtastamplituden und der Varianz. Es kann, wie in Abbildung 16, nach Logarithmieren in dB dargestellt werden.

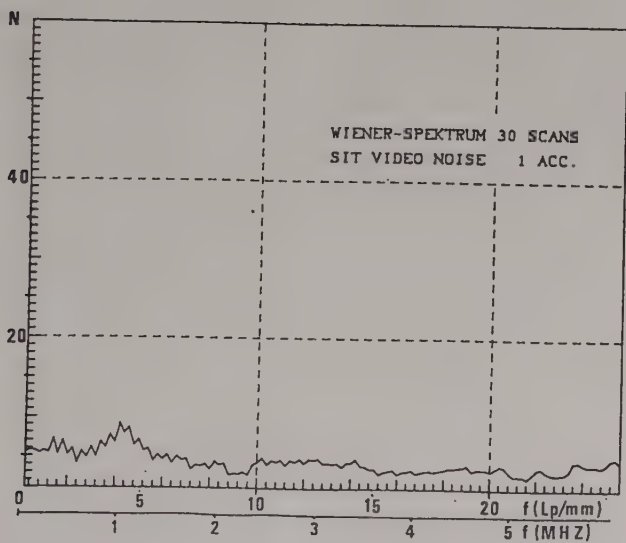
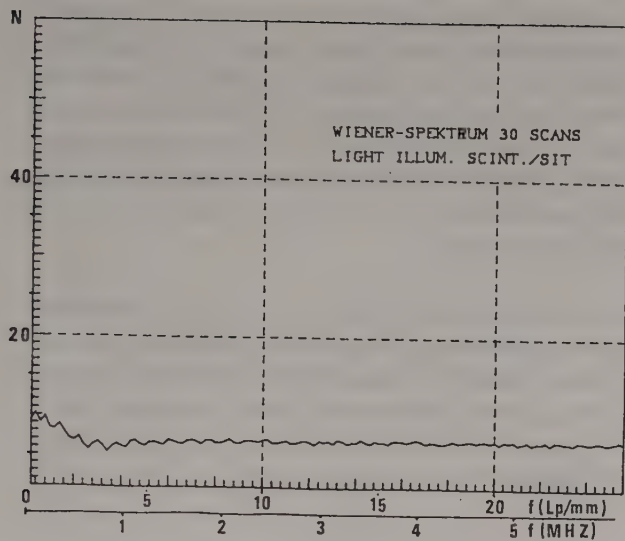
Neben dem Quantenrauschen N_Q im Endbild des Elektronenmikroskops erzeugt das Rauschen elektronischer Bauelemente gemäß der Systemübersicht in Abbildung 3, insbesondere jedoch des Videovorverstärkers, signalunabhängige Beiträge. Der Abschätzung in Größe und Verteilung dient die Aufnahme des Wienerpektrums in Fig. 11. Elektronische Rauscheinflüsse von Kamera (N_K), Verstärker (N_V) und nachgeschalteten elektronischen Bauelementen und Übertragungskanälen sind insbesondere im mittleren Bereich des Ortsfrequenzspektrums feststellbar.

Aufschlußreich ist es auch, als Signal dem Elektronenbildregistriersystem ein Fotonensignal anzubieten. Durch die geringere Energie der Photonen ist das Quantenrauschen bei gleicher Ausgangsleuchtdichte des Szintillators wesentlich verringert worden, Beiträge zum Wienerpektrum in Abb. 12 liefern bei Bestrahlung mit Weißlicht jetzt insbesondere die visuell erkennbare Struktur des Szintillators und der Faserplatte.

Die Schwankungen des Fotostroms müssen aus Gründen der Detailerkennbarkeit größer als die Schwankungen durch das additive Rauschen sein. Eine Abschätzung des Beitrages des Verstärkers ist in der Literatur für verschiedene Systeme gegeben worden /Kühl, 1972; Rust, 1982; Erhardt, 1980/.

Fig.11 Das Wienerpektrum der LLL-TV-Kamera, gewonnen bei homogener Beleuchtung des Szintillators mit Weißlicht, gibt den spektralen Einfluß von Inhomogenitäten und Shading-Einflüssen im Abbildungssystem wieder

Fig.12 Das Wienerpektrum zeigt bei ausgeschaltetem Eingangssignal die spektralen Anteile des elektronischen Rauschens



Vernachlässigbar ist der Einfluß des Rauschens in der Optik N_K und des AD-Wandlers N_{AD} aus der Systemübersicht. Diese Störgrößen sind im Vergleich zu den bisher diskutierten Rauscheinflüssen gering. Das optische Rauschen wird auch als Verteilungsrauschen bezeichnet und entsteht durch die Aperturbegrenzung des Systems. Aus der Anzahl der von einer Lichtquelle ausgehenden Quanten gelangt im Mittel nur ein bestimmter Anteil in die Apertur, dessen Schwankungen mit der Binominalverteilung beschrieben werden kann /Röhler, 1967/.

Das Quantisierungsrauschen entsteht im Analog-Digital-Wandler, wobei sich für gleichverteilte Abgleichamplituden bei 8-bit Auflösung ein Signal-Rausch-Leistungsverhältnis von 53 dB ergibt /Erhardt, 1980/. Weitere Störeinflüsse treten im Betrieb des Wandlers auf, wenn die Quantisierungsstufen nicht mehr äquidistant über den Aussteuerbereich verteilt sind.

Unter Benutzung der Formel 31 wurde die DQE für die verschiedenen Konfigurationen errechnet und in Fig. 13 in Abhängigkeit von der Elektronendichte aufgetragen. Die Benutzung der Werte des Signal-Rausch-Verhältnisses aus Abbildung 16 führt bei der LLL-TV-Kamera und Leuchtdichten $< 10^{-11} \text{ A/cm}^2$ zu einer DQE größer 1. Da dies aus physikalischen Gründen nicht möglich ist, muß das Rauschen als zu gering abgeschätzt worden sein. Durch eine Entfaltungsoperation mit der MTF aus Abb. 6 läßt sich erreichen, daß das System bis zur Abtastgrenze nicht bandbegrenzt. Dadurch werden die Elektronenimpulse aus dem additiven Rauschuntergrund hervorgehoben. Die mittlere Signalamplitude bleibt durch die Entfaltung erhalten. Das aus dem Histogramm ermittelte Rauschen steigt jedoch an.

Bei der üblichen Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses ist zu beachten, daß zwischen den Signalen selbst und den Signalen und dem Rauschen Überlappungen auftreten können, die ein zu geringes Signal-Rausch-Verhältnis vortäuschen. Außerdem kann ein Signal-Rausch-Verhältnis exakt nur für eine bestimmte Ortsfrequenz angegeben werden, da über dem Frequenzbereich relative Verschiebungen auftreten können.

In diesem Zusammenhang ist auch wichtig, daß - wie in den Abbildungen 11 und 12 nachgewiesen - das additive Rauschen insbesondere im Bereich geringer und mittlerer Ortsfrequenzen auftritt, so daß das Signal durch eine Entfaltung vom Rauschhintergrund abgehoben werden kann.

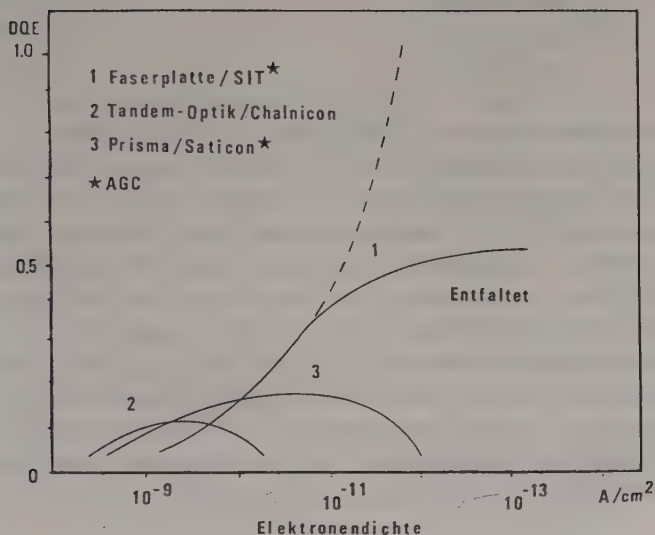


Fig.13 Der Verlauf der DQE für verschiedene Konfigurationen in Abhängigkeit von der Elektronendichte. Bei niedrigen Stromdichten und hoher Verstärkung der LLL-TV-Kamera täuscht der Rauschhintergrund eine zu große DQE vor. Durch eine Entfaltungsoperation lassen sich die Elektronenimpulse aus dem Hintergrund hervorheben und die DQE wird reduziert

IV.2.6 Die Bestimmung einer Vergrößerungs-/ Auflösungs- charakteristik

In Abbildung 14 ist für verschiedene Konfigurationen die erreichbare Auflösung in Abhängigkeit von der Vergrößerung gegeben. Diese Kennlinien sind aus der erweiterten Rose-Gleichung (Formel 34) für den Objektkontrast $C=0.5$ mit den Signal-Rausch-Verhältnissen aus Fig. 16 und den MTFs aus Fig. 6 gerechnet. Die angegebenen Elektronendichten gelten für 10000 fache Vergrößerung. Weiterhin wird angenommen, daß die Bandbegrenzung des TEMs auch bei hohen Vergrößerungen vernachlässigbar ist. Die MTF des Aufnahmesystemes bestimmt das erreichbare Auflösungsvermögen bei niedrigen Vergrößerungen. Zu hohen Vergrößerungen hin wird die Auflösung durch die DQE beeinflusst, da infolge verringerter Leuchtdichte das Signal-Rausch-Verhältnis abnimmt. Diese beiden Extreme hüllen die Auflösungscharakteristik ein.

Die durchgeführten Berechnungen zeigen eine gute Übereinstimmung mit der tatsächlichen Erkennbarkeit biologischer Strukturen. Als Beispiel wurden Schwellenbeobachtungen an Kohlenfasern (0.34 nm), an Myelinfasern (19 nm) und an Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (ca. 150 nm) in Abhängigkeit von der Vergrößerung durchgeführt.

Es soll noch ein Vergleich mit der fotografischen Schicht angestrebt werden. In einem mittleren Schwärzungsbereich S 1-1.5 arbeitet die fotografische Schicht linear /Frieser, 1975/. Ein Elektron kann dabei mehrere Emulsionskörner entwickelbar machen, wodurch die Detailerkennbarkeit der fotografischen Platte durch das Quantenrauschen, verbunden mit Korngrößeschwankungen begrenzt wird. Die von der Beschleunigungsspannung abhängige Diffusion der Elektronen bewirkt eine geringe Bandbegrenzung, so daß die MTF gleich 1 gesetzt werden kann. Mit einer DQE von 0.75 ergibt sich die gestrichelte Charakteristik in Fig. 14. Der Film erreicht demnach schon bei niedrigen Vergrößerungen das Auflösungsvermögen des elektronenoptischen Gerätes.

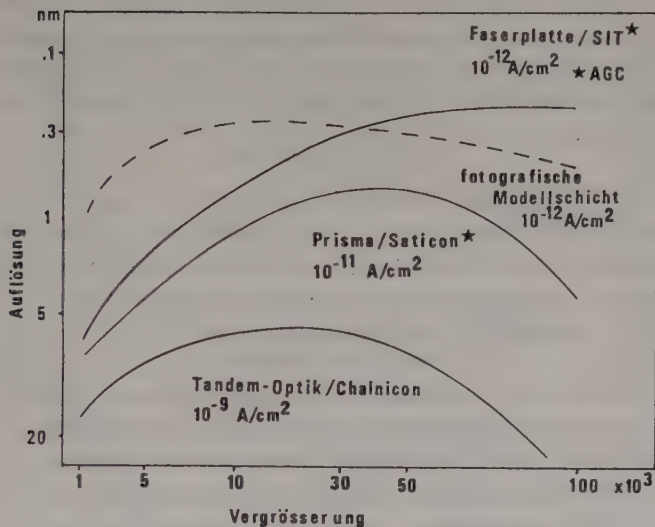


Fig.14 Die Vergrößerungs- / Auflösungscharakteristik zur zusammenfassenden Beschreibung der Leistungsfähigkeit und Wiedergabequalität von TV-EM-Abbildungssystemen, ermittelt aus der erweiterten Rose-Gleichung. Die fotografische Schicht zeigt sich im unteren Vergrößerungsbereich durch die geringere Bandbegrenzung den technischen Systemen überlegen.

Die Rose-Gleichung kann das visuelle Detektionsvermögen bei einer bestimmten Leuchtdichte an durch Rauschen begrenzten Szenen richtig voraussagen. Die Rose-Beziehung wird durch neuere experimentelle Arbeiten bestätigt /Sullivan, 1983/. Ohne Einschränkung ist das Kriterium auch bei Detektion durch digitale Tiefpaßfilterung anwendbar/van Heel, 1981/.

Es gibt jedoch andere Detektionsalgorithmen, die empfindlicher als das menschliche Auge oder als eine Tiefpaßfilterung sind. So bedarf der Matched Filter gegenüber dem Rose-Kriterium einer um den Faktor 8 s/d geringeren Dosis um ein Objekt mit dem Durchmesser s zu detektieren, wenn d die Apertur ist.

Die verschiedenen digitalen Verfahren können Modelle können unter dem Begriff des Detektionsnutzeffektes diskutiert werden, der als quadratische Abweichung vom idealen Detektor (Matched Filter) definiert ist (siehe Anhang A.2). In Abbildung 15 ist der Verlauf für verschiedene Modelle wiedergegeben, wobei das Produkt aus Objektdurchmesser s und Kontrast K konstant bleibt. Im Vergleich mit dem idealen Detektor ist der Detektionsnutzeffekt an der Auflösungsgrenze $s=d$ für das Template Matching nach Frank /1980/ 33%, für das Varianzverfahren nach van Heel /1981/ 20% und für das Rose-Kriterium 4% (siehe Herleitung im Anhang). Die Verfahren nach Frank und van Heel zeigen sich der digitalen Tiefpaßfilterung insbesondere bei der Detektion großflächiger Objekte überlegen.

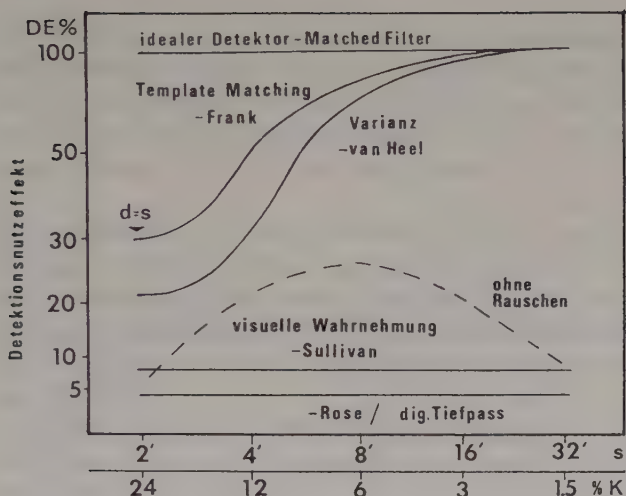


Fig.15 Vergleich des Detektionsnutzeffektes (DE) biologischer und künstlicher, digitaler Systeme unter der Bedingung $\text{Kontrast (K)} \cdot \text{Objektdurchmesser (s)} = \text{const.}$. Die Apertur d ist zu 2 Bogenminuten angenommen. Die experimentellen Ergebnisse der physiologischen Optik (nach Sullivan und Rose) weisen einen konstant niedrigen Nutzeffekt auf; ohne Rauscheinflüsse zeigt sich ein Gang mit der Kontrastsensitivitätsfunktion. Digitale Detektionsmodelle (nach Frank und van Heel) verhalten sich bei großen Objektdurchmesser nahezu ideal.

IV.2.7 Die Bestimmung der Informationsdichte und Kapazität

Die Berechnung der Informationskapazität der Elektronenbild-Registriersysteme ergibt nach Formel 7 für 512×512 Bildpunkte und bei einer Dynamik von 8 bit eine Speicherkapazität von $2.6 \cdot 10^6$ bit. Bei einer Targetfläche von 1 cm^2 ist eine Informationsdichte von $2.6 \cdot 10^6 \text{ bit/cm}^2$ abspeicherbar.

Zur Berechnung der Informationsdichte nach Formel 9 muß die Fläche unter der MTF bekannt sein. Die Übertragungsfunktionen in Fig. 6 lassen sich durch Lorentz-Funktionen approximieren, bei denen das Integral aus der Grenzfrequenz und der Halbwertsbreite mittels eines analytischen Ausdruckes bestimmt wird /Kriete und Boseck, 1982/.

Die Durchrechnung für die erprobten Systeme nach der Linfoot-schen Formel, mit den Übertragungsfunktionen aus Fig. 6 und den Signal-Rausch-Verhältnissen aus Fig. 16 bei einem Grauwert von 200, ergibt für die seitliche Konfiguration 750 bit/cm^2 , für die Tandem-Optik/Chalnicon-Kamera 500 bit/cm^2 und für die Restlicht-verstärker-Konfiguration 200 bit/cm^2 . Die Informationskapazität ist damit für die tatsächlich zu erwartende Informationsdichte mehr als ausreichend. Zu beachten ist allerdings, daß die angenommene statistische und niederkontrastige Objektmenge nur selten als Objekt auftritt. Als Gegenbeispiele seien stark kontrastierte biologische Schnitte, regelmäßige kristalline Strukturen oder strukturreiche Einzelobjekte (Viren) genannt, an denen hohe Informationsdichten auftreten können.

Die Berechnung des Informationsgehaltes kann mit der fotografischen Informationsaufzeichnung verglichen werden. An Mikrographien können nach Frieser /1975/ vergleichbar bemerkenswert hohe Informationsdichten von 10^6 bit/cm^2 auftreten. Diese Tatsache wird bei der Datenspeicherung mittels Elektronenstrahlen ausgenutzt. Andererseits ist die Informationskapazität der fotografischen Schicht bei gleicher Fläche durchaus mit der digitalen Speicherung vergleichbar.

An Hand nebenstehender Übersichtstabelle können die Vor- und Nachteile der erprobten Konfigurationen zusammenfassend diskutiert werden.

- Tandem-Optik/Chalnicon-Kamera

Diese Konfiguration hat ein nur mäßiges Gesichtsfeld und ist darüber hinaus sehr unempfindlich. Es können mit dieser Ausrüstung nur Aufgaben im unteren elektronenmikroskopischen Vergrößerungsbereich angegangen werden. Das maximal erreichbare Auflösungsvermögen ist oberhalb von 20 nm.

- Spiegelgruppe/Saticon-Kamera

Der seitliche Anschluß zeichnet sich durch ein großes Gesichtsfeld aus. Die Eigenschaften von Optik und Kamera lassen den Einsatz über den gesamten elektronenmikroskopischen Vergrößerungsbereich zu; Strukturen bis etwa 1 nm können aufgelöst werden. Digitale on-line Bildverarbeitung ist auch ohne Vorverarbeitungsschritte möglich.

- Faserplatte/Restlichtverstärkerkamera

Diese Konfiguration hat ein nur geringes Gesichtsfeld, ist jedoch sehr empfindlich und eignet sich insbesondere für Detailstudien im oberen elektronenmikroskopischen Vergrößerungsbereich. Der Nachteil liegt in einer schlechten Bildqualität, dies äußert sich in störenden Faserplattenstrukturen, einem Elektronenrauschen und einer nur mäßigen MTF. Diese Einflüsse können durch eine on-line Bildverarbeitung teilweise überwunden werden.

Tabellarische Übersicht

Konfigurationen	Tandem-Optik/ Chalnicon-TV	Spiegelgruppe/ Saticon-TV	Faserplatte/ SIT-LLL-TV
-----------------	-------------------------------	------------------------------	----------------------------

1)			
Gesichtsfeld	8%	100%	4%
Aussteuerbereich in A/cm^2	-8 10 -5x10	-9 -11 10 -3x10	-9 -12 10 -13
MTF-Halbwertsbreite in Lp/mm	7	8	4
2)			
erreichbares AV in nm	10	1	0.3
SNR nach 256 Akk. in dB	30	35	20
maximale DQE	0.1	0.2	0.5
3)			
Informationsdichte in $bits/cm^2$	500	750	200

1)

100% entsprechen 25 cm^2 der Plattenkamera

2)

bei einem Objektkontrast von 0.5

3)

bei Abbildung eines niederkontrastigen Bildes
mit statistisch verteilten Grauwerten

IV.3 Bildvorverarbeitung

IV.3.1 Einleitung

Digitale Verfahren zur Bildvorverarbeitung können unter folgenden Kategorien eingeordnet werden:

- Bildverbesserung (image enhancement)
- Bildrestauration (image restauration)
- Datenkompression und Bildkodierung (data compression and image coding)

Die Übergänge zwischen den einzelnen Gebieten sind fließend. Eine Bildvorverarbeitung wird oftmals unter mehreren Gesichtspunkten durchgeführt. Einzelne Methoden werden u.a. bei Hall /1979/ und Hawkes /1984/ ausführlich diskutiert.

In diesem Teil der Arbeit wird zunächst die Möglichkeit zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Bildakkumulation untersucht. Ein nichtlineares Verfahren zur Filterung des Rauschens im Ortsbereich wird erprobt, welches sowohl Gesichtspunkte der Bildrestauration als auch der Bildkodierung einschließt. Dieses als "Noise Cheating" (frei übers.: Rauschbetrug) bezeichnete Verfahren orientiert sich an einer Methode zur Verarbeitung verrauschter, niederkontrastiger Fotografien.

Im Sinne der Bildverbesserung werden verschiedene Verfahren diskutiert, die ortsinvariante Störungen und Empfindlichkeitsschwankungen des Aufnahmesystems reduzieren. Diese Einflüsse täuschen eine Bildinformation vor und müssen vor einer weiteren Auswertung Beachtung finden. Um die Kanalkapazität bei der elektronenmikroskopischen Abbildung möglichst groß zu halten, ist die Einstellung eines Optimalfokus am TEM unumgänglich. Dazu werden verschiedenen Fokuskriterien verglichen, die die Einstellung der Bildschärfe am TEM unterstützen.

IV.3.2 Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Bildakkumulation

Eine Bildintegration läßt sich auf dem Kameratarget, dem Monitor und im digitalen Bildspeicher durchführen.

Die Summation von Ladungen auf dem Kameratarget kann durch Verlängerung der Abtastzyklen über die TV-Abtastzeit hinaus erreicht werden, sofern keine Sättigungseffekte auftreten. Eine wesentliche Verlängerung der Integrationszeit ist bei visueller Beobachtung des TV-Bildes durch einen nachleuchtenden Monitor möglich. Die speziellen Phosphore des Leuchtschirms integrieren das TV-Signal über 30-90 Sekunden /Anderson, 1968/.

Bei der Integration im digitalen Bildspeicher entspricht die Anzahl der Akkumulationen n einer verlängerten Abtastzeit t . Der auf 16 bit ausgelegte RAM des benutzten Imageprozessors eignet sich zur Akkumulation von 256 digitalisierten Bildern von je 8 bit für die Dauer von acht Sekunden.

Figur 16 zeigt die Anhebung des Signal-Rausch-Verhältnisses für 1,2,8 und 256 Akkumulationen des LLL-TV-Kamerasystems im Vergleich zu 256 Akkumulationen der seitlichen Kamerakonfigurationen und dem Tandemanschluß unterhalb des Elektronenmikroskops.

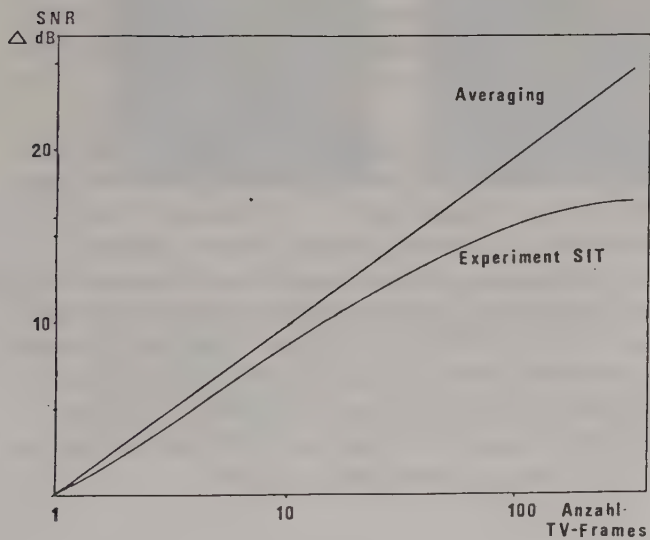
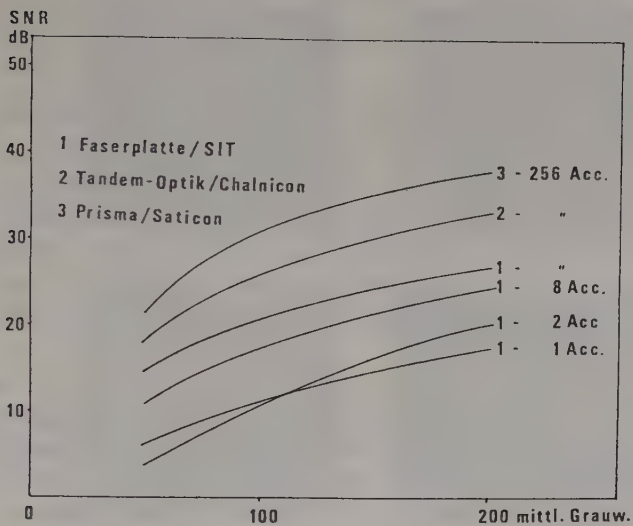
Für zwei Akkumulationen ergibt sich am Restlichtverstärkersystem eine vorübergehende Verschlechterung des Signal-Rauschverhältnisses. Dieser Effekt kann auf die lag-time der Kamera zurückgeführt werden /Rust, 1982/.

Es konnte gezeigt werden, daß die Bildakkumulation optimal ist und im Ergebnis durch eine Rauschfilterung, wie dem rekursiven Filter, nicht übertroffen werden kann /Erasmus, 1982/. Die Ergebnisse für den Grauwert 200 zeigen für die Restlichtverstärkerkamera in Abbildung 17, daß bei mehr als 64 Akkumulationen die gemessene Zunahme mehr und mehr von der theoretisch erwarteten Funktion abweicht, die proportional zur Wurzel der Anzahl der gemittelten Einzelscans ansteigt.

Die beobachtete Abweichung läßt sich oft auf eine Objektbewegung zurückführen. Da hier jedoch mit homogener Beleuchtung gearbeitet wird, muß eine andere Ursache gefunden werden. Es bietet sich an, neben Nachleuchteffekten die ortsfesten Störungen wie die Körnigkeit des Szintillators und der Faserplattenstruktur als Erklärung heranzuziehen. Diese Faktoren werden bei geringen Leuchtdichten erst nach Durchführung von Akkumulationen andeutungsweise sichtbar.

Fig.16 Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) durch Bildakkumulation des Signales der LLL-TV-Kamera und Vergleich mit dem erzielbaren SNR anderer Konfigurationen

Fig.17 Relative Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisse der LLL-TV-Kamera für einen konstanten Grauwert (200) durch Bildakkumulation und Vergleich mit der theoretischen Voraussage



Methoden zur Rauschfilterung im Ortsbereich, wie der Median-Filter oder eine Tiefpaßfilterung durch örtliche Bildinterpolation, setzen in der Regel auch die Auflösung herab. Abhilfe schafft dabei ein von Zweig et al. /1975/ entwickeltes Verfahren, welches diesen Nachteil berücksichtigt (Noise-Cheating). Diese Methode ist zur Rauschfilterung an fotografischen Schichten entwickelt worden, um den Einfluß der Filmkörnigkeit bei hoher Nachvergrößerung zu mindern.

Das Verfahren, in Abbildung 18 erläutert, kombiniert zunächst die Bildpunkte des Originalbildes zu sich nicht überlappenden 2×2 Pixelgruppen. Die Varianz des Rauschens am so geglätteten Bild hat dann ein Viertel der Varianz des Originalbildes, vorausgesetzt das Rauschspektrum ist über alle Ortsfrequenzen konstant. Die Quantisierung des geglätteten Bildes kann verändert werden, z.B. so, daß die Grauwertstufen einen Abstand einnehmen, der dem Vierfachen der Standardabweichung des Rauschens entspricht. Dadurch wird sichergestellt, daß mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% korrekt quantisiert worden ist /Billingslay, 1975/.

Die requantisierten Pixelgruppen werden nun in ihrer 3×3 Nachbarschaft untersucht. Stellt sich dabei heraus, daß die umliegenden Bildelemente im Grauwert vom Zentrum verschieden sind, so wird dem zentralen Bildelement ein neuer Grauwert zugeordnet. Grenzt der Bildpunkt an einen Grenzbereich von unterschiedlichen Grauwertflächen, so wird dieser in die vier korrespondierenden Pixel des Originalbildes geteilt und diesen Elementen die requantisierten Graustufen zugeteilt. Ein einfacher Algorithmus besteht darin, den Wert des Pixels auf diejenige Graustufe in der 4×4 Nachbarschaft zu setzen, die die geringste Differenz zwischen dem ursprünglichen requantisierten Grauwert ergibt.

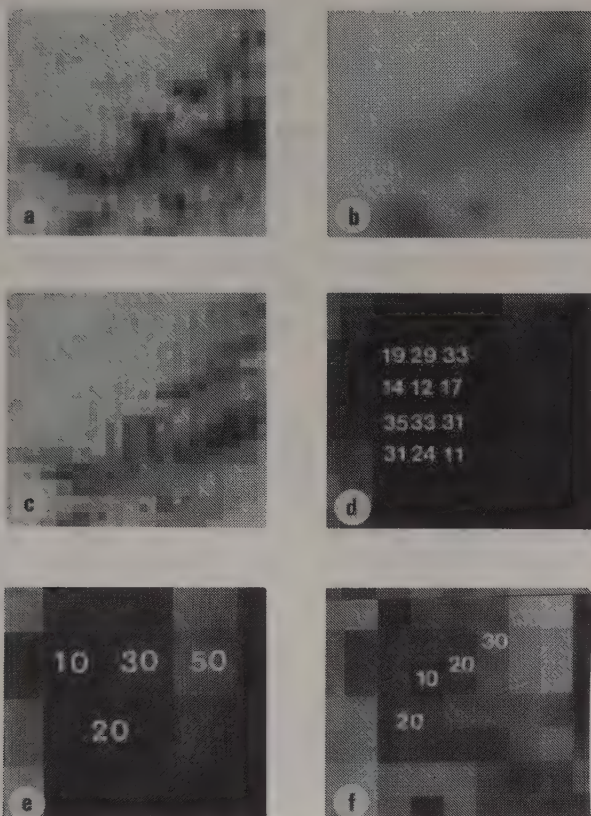


Fig.18 Reduktion des Rauschens an dem vergrößerten Detail einer doppelten Kernmembran (a). Verglichen wird die Wirkung eines 7×7 Median-Filters (b) und des Noise-Cheating Verfahrens (c). Die einzelnen Stufen des Noise-Cheating Verfahrens, an einem Bildausschnitt (d) erläutert, sind Zusammenfassung und Requantisierung von Pixelgruppen (e) und die Restauration der Kantenstrukturen des Originals (f)

Das Verfahren kann in seiner Wirkung auch durch die Analyse der Entropie von Koppelfeldern nach Formel 10 untersucht werden. Figur 19 zeigt die Erhöhung des Ordnungszustandes an, der sich bei einer Requantisierung der Grauwerte und der beschriebenen Verarbeitung von Bildpunktnachbarschaften gerade im Bereich hoher Ortsfrequenzen einstellt. Andererseits kann im Vergleich zum akkumulierten Bild aboeschätzt werden, bis zu welchem Grad eine Requantisierung sinnvoll ist, da Verluste in der Dynamikauflösung auch einen objektabhängigen Informationsverlust bedeuten. An den hier untersuchten Bildern wurde der den Grauwertumfang deshalb auf nicht weniger als 6 bit reduziert.

Dieses Verfahren kann auf elektronenmikroskopischen Einzelaufnahmen angewandt werden, wenn die Möglichkeit einer Bildakkumulation nicht möglich ist, sei es aus technischen oder präparatbedingten Gründen.

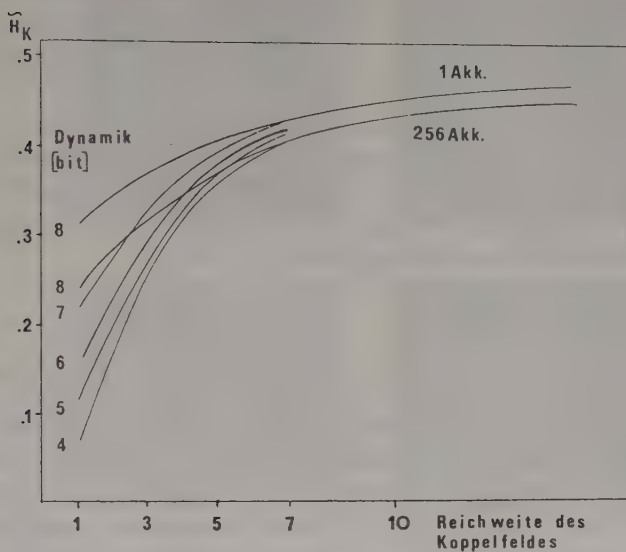


Fig.19 Werteverlauf der normierten Entropie von Koppelfeldern. Gezeigt wird der Einfluß der Bildakkumulation und der Anwendung des Verfahrens Noise-Cheating mit unterschiedlicher Dynamik auf den Ordnungszustand eines Testbildes

IV.3.4 Analyse und Reduktion systembedingter Inhomogenitäten und Störungen

Die digitalisierten Bilder des elektronenmikroskopischen Registersystems weisen eine Reihe systembedingter Inhomogenitäten und Störungen auf, die Zeit- und ortsinvariant sind. Diese Einflüsse der Übertragungskette können Informationen vortäuschen und damit dem Erkennungsprozeß abträglich sein.

1) Struktur des Szintillators

Da die Zinksulfidkörner des Fluoreszenzschirmes eine Größe von 3-5 μm aufweisen, macht sich dies auch bei einer 1:1 Abbildung und einem objektseitigen Pixeldurchmesser von 10 μm nicht störend bemerkbar. Strukturen des Leuchtschirmes sind daher auf Empfindlichkeitsschwankungen durch eine herstellungsbedingte ungleichmäßige Dichte und Dicke der ZnS-Schicht zurückzuführen. Abhilfe könnten Einkristallmaterialien schaffen, die jedoch eine geringere Auflösung und Empfindlichkeit besitzen. Fehler im mittleren Bereich des Ortsfrequenzspektrums können durch Bildoperationen erfaßt werden, die mit "Contour Mapping" Algorithmen verwandt sind. Dazu gehört die Subtraktion eines tiefpaßgefilterten Bildes (z.B. 16×16 Boxcar-Filter) vom Original. Fig.20 zeigt das Resultat einer solchen Operation.

2) Struktur der Faserplatte

Der Durchmesser der einzelnen Glasfasern beträgt etwa 5 μm , womit etwa 4-6 einzelnen Fasern auf einen Bildpunkt fallen. Im mittleren Ortsfrequenzbereich sind regelmäßige Strukturen festzustellen, die durch eine wabenförmige Bündelung einzelner Fasern und durch eine Koppelung elektronenmikroskopischer und kameraseitiger Faserplatte verursacht werden. Abb. b zeigt eine im Kontrast verstärkte Darstellung der Faserplattenstruktur bei homogener Beleuchtung.

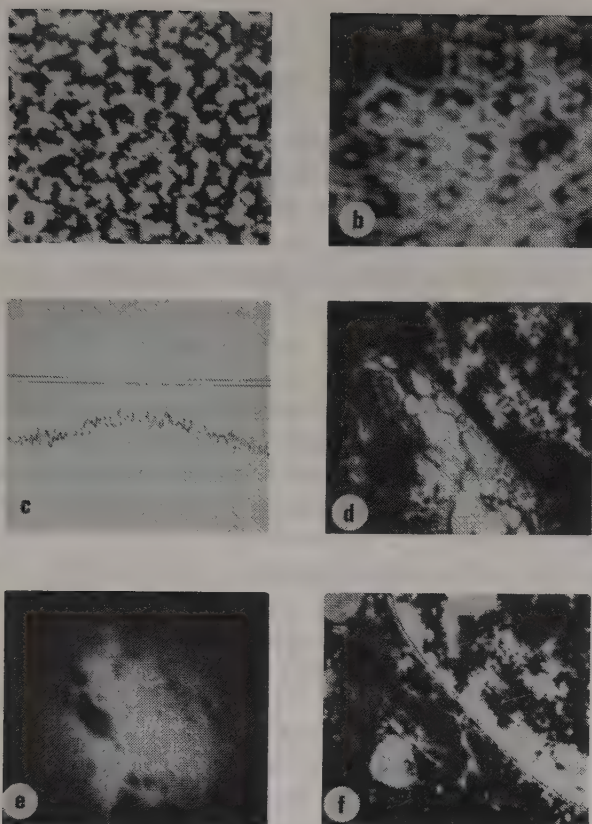


Fig.20 Ortsfeste Störungen des Aufnahmesystems zeigen die Abbildungen a-c. Durch eine Contour Mapping Operation werden die Szintillatorstrukturen dargestellt (a) und nach Kontrastverstärkung ergibt sich die hexagonale Faserplattenstruktur (b). Der Bildausschnitt ist 100x100 Pixel (a,b). Shading und Inhomogenitäten im Bildaufnahmesystem zeigt ein vertikaler Scan über die Bildmitte (c). Zur Reduktion der Störungen wird eine Dunkelfeldaufnahme bei 80 KV (e) durch die entsprechende Hellfeldaufnahme (d) dividiert. Der dadurch angehobene Bildkontrast erleichtert die Detailwahrnehmung (f)

3) Singuläre Bildfehler

An Kameras geringer Qualität können Fehler im Target zum Ausfall einzelner Bildelemente führen, an denen konstruktionsbedingt ein konstant hoher Grauwert auftritt. Auf wenige Bildpunkte beschränkt sind auch Staubbunreinheiten, die im Immersionsöl zwischen den beiden Faserplatten auftreten können. Diese Störungen sind oftmals nicht ortsfest, sondern zeigen infolge der betriebsbedingten Erwärmung des Adapters eine Drift.

4) Shading

Eine zum Gesichtsfeldrand der Kamera abnehmende Empfindlichkeit wird im engeren Sinn als Shading bezeichnet. Dieses Shading kann durch unterschiedliche Längen der Fasern im Faserplattenanschluß oder durch die Abbildungsoptik erzeugt werden. Abb.20c zeigt das Shading eines Adapters im kontrastverstärkten Bild. Durch eine Histogrammoperation kann bei homogener Beleuchtung das Shading quantifiziert werden.

5) Ungleichmäßige Ausleuchtung

Dieser Effekt tritt insbesondere bei Kameras geringer Sensitivität auf, wenn der Kondensor bei hohen Vergrößerungen in der Nähe des Cross-Overs abbildet und dadurch eine ungleichmäßige Leuchtdichteverteilung auf dem Szintillator entsteht.

6) Dunkelstrom

Der Dunkelstrom geht additiv ein und entsteht bei der fotoelektronischen Meßgrößenwandlung und durch thermische Ladungsträgerbewegungen im Target.

Es gibt verschiedene Methoden, die aufgeführten Störungen mittels Bildverarbeitung zu reduzieren. Der Einsatz eines Rangfolgeoperators (Median - Filters) ist insbesondere bei der Beseitigung singulärer Störungen zweckmäßig, jedoch fällt die Herabsetzung der Auflösung ungünstig ins Gewicht.

Eine Shadingkorrektur läßt sich erreichen, wenn man durch das tiefpaßgefilterte Bild dividiert, wobei eine Normierung auf den maximalen Grauwert vorgenommen wird. Die Korrekturwerte liegen dadurch unterhalb von 1 und oberhalb von 0. Da jedoch eine Objektabhängigkeit nie ganz ausgeschlossen werden kann, ist die Division einer bei homogener Beleuchtung gewonnenen Shadingkorrektur vorzuziehen. Mit dieser Methode können auch Schwankungen in der Empfindlichkeit des Szintillators korrigiert werden.

Es soll noch angemerkt werden, daß bestimmte Algorithmen keiner Shadingkorrektur bedürfen, z. B. wenn es nur um die Bestimmung von Änderungen zwischen Grauwerten geht. Dies ist bei den Verfahren zutreffend, die die Nullfrequenz des Ortsfrequenzspektrums nicht bewerten.

Durch Subtraktion läßt sich eine Korrektur des Dunkelstromes erreichen, wobei ein konstanter Grauwert einer "Leeraufnahme" herangezogen wird. Eine andere, nicht digitale Methode besteht in der Kühlung des Targets.

Im Frequenzbereich kann nach Fouriertransformation mit einem Scan bei homogener Beleuchtung eine Entfaltung vorgenommen werden. Das Verfahren erscheint dann zweckmäßig, wenn die Möglichkeit einer schnellen Fouriertransformation gegeben ist oder eine Auswertung des Bildes im Frequenzbereich angestrebt wird. Diese Methodik kann neben singulären Störungen, Empfindlichkeitschwankungen und insbesondere regelmäßige Inhomogenitäten (z.B. die wabenförmige Struktur der Faserplatte) reduzieren. Dies Verfahren wurde auch bei der Herstellung von Fig.1d eingesetzt, wobei im Frequenzraum mit dem Kehrwert der Übertragungsfunktion aus Fig. 6 multipliziert wurde.

Eine andere Möglichkeit bietet eine Hellfeld/Dunkelfeld-Kombination (Abb.d-f). Das Hellfeld wird qualitativ durch die Funktion beschrieben (mit Ordnungszahl Z, Beschleunigungsspannung U und Shadingfunktion S) :

$$F_H = f (I_H (x,y,Z,U) \cdot S(x,z)) \quad (37)$$

Entsprechend lautet die Funktion für das Dunkelfeld:

$$F_D^2 = f (I_D^2 (x,y,Z,U) \cdot S(x,y)) \quad (38)$$

und aus einer Division ergibt sich:

$$F_{D/H} = f (I_{H/D} (x,y,Z,U)) \quad (39)$$

Der Vorzug des Verfahrens liegt darin, daß sowohl das invariante Empfindlichkeitsmuster des Aufnahmesystems als auch eine ungleichmäßige Ausleuchtung weitgehend verringert werden. Ebenso läßt sich der inelastische Streuanteil durch das Dunkelfeld reduzieren.

IV.3.5 Erprobung verschiedener Fokuskriterien im unteren elektronenmikroskopischen Vergrößerungsbereich

Zur Auffindung und Einstellung des Optimalfokus vor der Bildspeicherung sind neben der visuellen Einstellung, auch mit technischen Hilfsmitteln, verschiedene off-line Verfahren an Mikrografien erprobt worden /Felten, 1981/. Für die direkte Bildfassung mittels fernsehtechnischer Anlagen bietet sich eine on-line Methode an. Als Kriterien können diejenigen Funktionen herangezogen werden, die schon in der Lichtmikroskopie erfolgreich eingesetzt werden konnten /z.B Jarvis, 1976; Kriete und Boseck, 1982; Harms, 1982; Block, 1983/. Dazu wurde eine Methode entwickelt, die nach einer Bildakkumulation zur Rauschfilterung in einem zentralen Bildbereich von 128x128 Bildpunkten die Bildschärfe nach drei Kriterien bewertet:

1) Laterale Hemmung (LTI)

$$LTI = \sum_{i=1}^{N-1} |x_i - 0.5 (x_{i-1} + x_{i+1})| \quad (40)$$

2) Sum Modulus Difference (SMD)

$$SMD = \sum_{i=1}^N |x_i - x_{i-1}| \quad (41)$$

3) Gray Level Variance (GLV)

$$GLV = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (42)$$

Es wurden mehrere Fokusreihen mit der LLL-TV-Kamera aufgenommen. Abbildung 21 zeigt den Verlauf an einem biologischen Objekt bei 10000 facher Instrumentenvergrößerung.

Von den oben genannten Autoren sind auch Versuche unternommen worden, mittels der Entropie die Optimalfokusbestimmung durchzuführen. Es ergab sich jedoch ein objektabhänges, gegenläufiges Verhalten der Entropie. An kontrastreichen Strukturen können bei Defokussierung durch Verwaschung neue Grauwerte auftreten, die zu einer Erhöhung der Entropie führen.

Um dennoch ein informationstheoretisch abgeleitetes Kriterium anzugeben, wird die Entropie von Koppelfeldern zur Bewertung der Schärfe erprobt. Abbildung 21 b,c zeigt die Ergebnisse für Koppelfelder der Reichweite 1, 3 und 5 Bildpunkte. Es ergibt sich, wie bei den anderen Kriterien, ein widerspruchsfreier und eindeutiger Verlauf. Die Ausprägung des Maximums nimmt mit ansteigender Reichweite der Koppelfelder ab. Für ein Fokuskriterium sind insbesondere die Grauwertübergänge zwischen kleinen Bildelementen wichtig, da hier die Ordnungszustände durch eine Defokussierung besonders verändert werden.

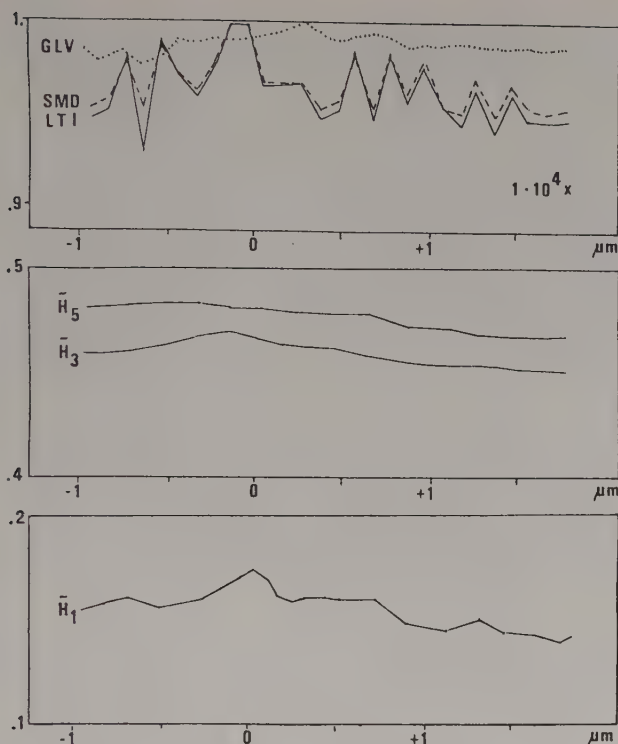


Fig.21 Werteverlauf von Fokuskriterien zur Unterstützung der Schärfeeinstellung am TEM (-/+ = Unter-/ überfokus). In (a) sind die Kriterien GLV, SMD und LTI auf ihren Maximalwert normiert. In (b) wird die Entropie von Koppelfeldern der Größe 5 und 3 Bildpunkte und in (c) von einem Bildpunkt dargestellt. Der Schärfeverlust bei Defokussierung wirkt sich insbesondere auf den Ordnungszustand kleiner Koppelfelder aus

IV.3.6 Ein iteratives Verfahren zum Bildalignement

In Bezug auf das Kapitel IV.5 dieser Arbeit ist es notwendig, Bilder, die bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen aufgenommen worden sind, zu überlagern. Es wird eine Methode zum Alignement solcher Bilder als Vorbereitung einer quantitativen Auswertung polychromatischer Bildinformationen auf experimentellem Weg entwickelt, die diese Bilder unter Nutzung von Phaseninformationen restauriert.

Unter Vorwegnahme der wichtigsten Ergebnisse dieses Kapitels soll festgestellt werden, das die Methode

- sich nur für eine bestimmte Klasse von Bildern zum Alignement eignet, d.h. sie besitzt keine Allgemeingültigkeit
- an den restaurierten Bildern zu einer Verringerung der Auflösung führt, da das Verfahren im Frequenzraum interpoliert
- im Ergebnis von dem Grad der Verschiebung und Drehung der eingegebenen Bilder abhängt, d.h. objektabhängig ist
- im Vergleich zu anderen Methoden, z.B. Varianz- oder Korrelationsanalysen, relativ rechenaufwendig ist.

Die Bedeutung der Phase am Bildaufbau wird an Testbildern erläutert und daraus ein Verfahren zum Bildalignement abgeleitet. Danach wird diese Methode auf die konkrete Problemstellung angewandt.

Die Phase $P(u)$ des Bildes ergibt sich nach der Fouriertransformation der Grauwertverteilung $f(x,y)$ zu:

$$\mathcal{F}\{f(x)\} = M(u) \cdot e^{jP(u)}$$

Bei der Darstellung des Amplitudenspektrums aus $f(u)$ sind in der Regel diskrete Maxima im Spektrum verteilt (Bspl. A.1b). Das Phasenspektrum dagegen läßt keine visuell interpretierbaren Vorzugsstrukturen erkennen. Die Phase ist dennoch ein fundamentaler Bestandteil für das Bild, da sie die Lage und Ausrichtung der Ortsfrequenzbestandteile im Bild festlegt, aus deren Überlagerung sich die Bildstruktur ergibt. Dies bedeutet, daß sich aus einem Amplitudenspektrum durch Kombination mit verschiedenen Phasenspektren völlig verschiedene Signale rekonstruieren lassen /Oppenheim und Lim, 1981; Wolff und Wollnack, 1984/.

Um die Bedeutung der Phase in der Bildverarbeitung aufzuzeigen, wird der Einfluß einer Bildoperation auf das Phasenspektrum an einer künstlichen Szene (Abb. A.1a) untersucht. An dem Bild bestehend aus 256x256 Bildpunkten wird eine 7x7 Medianfilterung durchgeführt und die sortierten Phasenspektren vor und nach der Filterung verglichen. Differenzen aus einer Phasenverschiebung werden durch Grauwerte wiedergegeben, wobei eine Verschiebung um 180 Grad den höchsten Grauwert (255) markiert. Abbildung A.1d zeigt daß im Bereich niedriger Ortsfrequenzen die Phase des Originalbildes weitgehend erhalten bleibt. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß die wesentlichen Bildstrukturen und deren Lage durch den Medianfilter unbeeinflusst bleiben. Regelmäßigkeiten in horizontaler und vertikaler Richtung werden durch Interpolation des Medianfilters am Bildrand hervorgerufen.

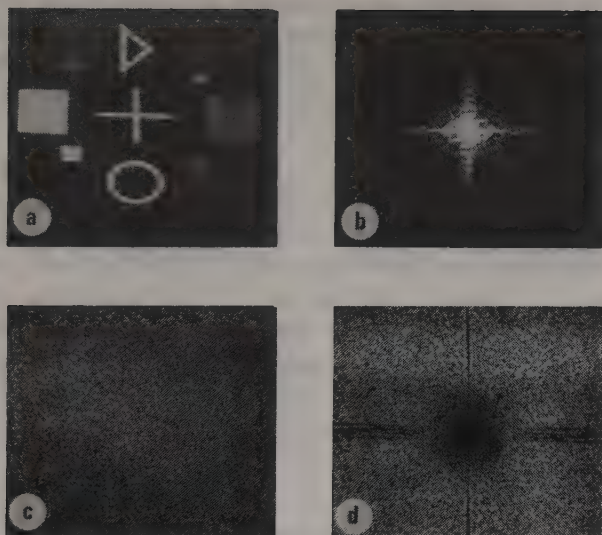


Fig. A.1 Die Kantenstrukturen eines Testbildes (a) führen zu diskreten Maxima im Amplitudenspektrum (b). Das zugehörige Phasenspektrum zeigt keine Vorzugsstrukturen (c). Nach Median-Filterung der Vorlage (a) wird das zugehörige Phasenspektrum von (c) abgezogen und Differenzen als Grauwerte kodiert (d). Der Median-Filter erhält Strukturen im unteren Ortsfrequenzbereich und erzeugt Bildrandeffekte

Um den experimentellen Beweis für die Bedeutung der Phase gegenüber der Amplitude zu führen und um auf eine mögliche Problemlösung hinzuweisen, wird das Phasenspektrum der Vorlage Abb. A.1a als Phasenreferenz mit den Amplituden gedrehter und gestreckter Bilder kombiniert (Abb. A.2).

Das rekonstruierte Bild b, gewonnen mit der Amplitude des um 3 Grad um das Zentrum des Bildes gedrehten Vorlage, zeigt alle wesentlichen Strukturen in der durch die Phasenreferenz gegebenen Lage. Allerdings ist das Bild von Störungen überlagert, die sich insbesondere auf dem dunklen Hintergrund und flächigen Objekten mit geringerem Grauwert abzeichnen. In solchen Bildabschnitten, wie z.B. dem Quadrat auf der rechten mittleren Bildseite, sind auch die Objektkanten nur diffus wiedergegeben.

Die Kombination mit der Amplitude eines um 35 Grad gedrehten Bildes zeigt, daß die Störungen im Bild durch diese Amplituden in das so rekonstruierte Bild übertragen werden (Abb. c und d). Die Grauwertinformation wird jetzt auch in hellen, kontrastreichen Bilddetails nicht mehr richtig wiedergegeben (siehe das Dreieck in oberer Bildmitte).

Ein Strecken des Bildes (Zoom) gegenüber dem Referenzbild um das 1.2fache zeigt insbesondere Störungen parallel zu den Strukturen der Vorlage (z.B. Kreis unten). Gerade in diesem Bild sind die Störungen besonders auffällig (Abb. e und f).

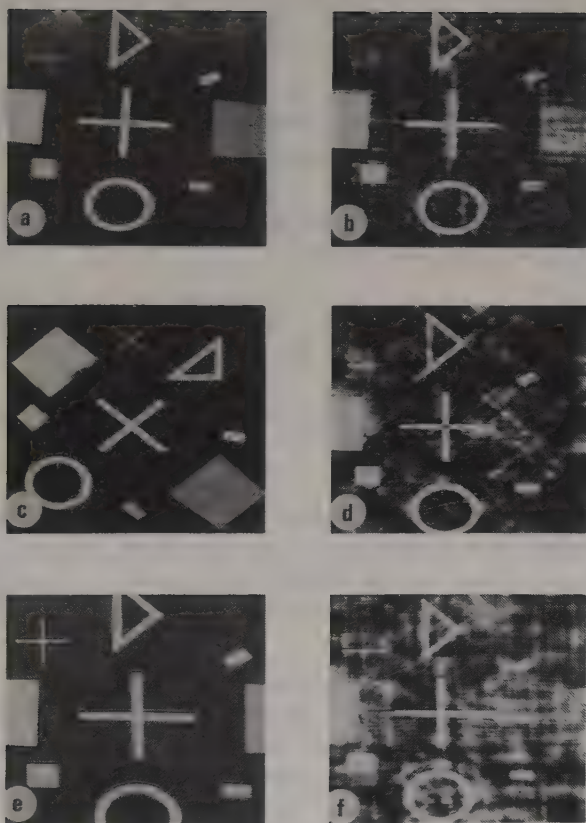


Fig. A.2 Die Bildkombination des Phasenspektrums aus Abbildung A.1 mit der Amplitude der um 3 Grad (a), um 35 Grad (c) und um das 1.2 fache vergrößerten Bildes zeigt die Bedeutung der Phase am Bildaufbau (b, d und f)

Die wichtigsten Ergebnisse aus diesem Experiment lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- die Kombination eines Amplitudenspektrums eines gedrehten oder gestreckten Bildes mit der Phase des Originals läßt nach Rücktransformation alle wesentlichen Bildstrukturen erkennen
- es treten Störungen auf, die mit den Strukturen der gedrehten oder gestreckten Bilder korrelieren
- die Wiedergabe schwacher kontrastloser Strukturen wird durch die auftretenden Störungen eher beeinflußt
- es zeigt sich eine Abhängigkeit vom Grad der Drehung und Streckung auf das Endergebnis.

Für eine Problemlösung ist es deshalb notwendig, insbesondere die Störungen zu beseitigen und es ist dafür Sorge zu tragen, daß die Grauwertinformationen im Endbild nicht verfälscht wiedergegeben werden. Es wird deshalb die Verwendbarkeit eines iterativen Verfahrens geprüft.

Iterative Verfahren, die aus einer bekannten Phase/Amplitude und einer geschätzten oder unvollkommenen Amplitude/Phase ein Bild rekonstruieren, werden u.a. bei Gerchberg und Saxton /1972/, Oppenheim und Lim /1981/ und Wolff und Wollnack /1984/ diskutiert.

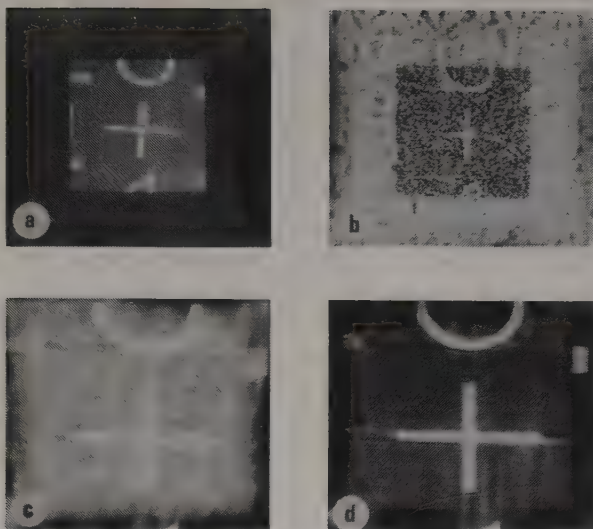
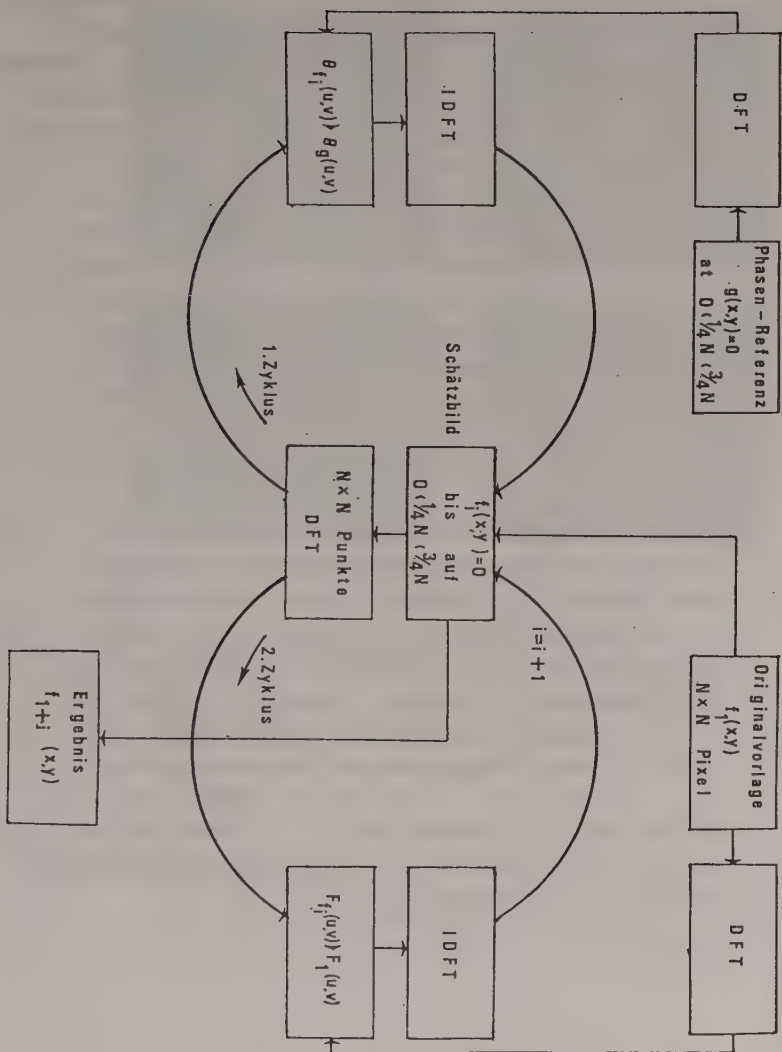


Fig. A.3 Ein iteratives Verfahren zur Bildrestauration benutzt einen verkleinerten Bildausschnitt (a). Nach Kombination dieses Bildes mit der Phasenreferenz zeigen sich Störungen (c), durch eine Falschfarbendarstellung auch im Bildrand erkennbar (b). Nach Nullsetzen des Bildrandes wird das Programm erneut durchlaufen und die Störungen werden verringert (d)

Die Idee des Verfahrens beruht darauf, mit einem verkleinerten Bild oder einem Ausschnitt die Iteration zu beginnen (Abb. A.3a, Diagramm A.4). Nach einer Fouriertransformation wird das resultierende Phasenspektrum durch die Phase des Referenzbildes ersetzt. Nach Rücktransformation ergibt sich Abb.A.3b als Schwarz-weißaufnahme eines farblich kodierten Bildes. Dadurch ist besonders deutlich erkennbar, daß sich die Störungen auch in dem Bildbereich fortsetzen, der zunächst gleich Null gesetzt war. Die Störungen sind Reste (Residuen), aus denen sich die Güte der Rekonstruktion ablesen läßt. Sie sind anschaulich darauf zurückzuführen, daß durch die neuen Phaseninformationen bestimmte Ortsfrequenzen so verschoben werden, daß sie sich in dieser Umstrukturierung bis in den zu Null gesetzten Bereich störend bemerkbar machen. Durch Löschen des äußeren Bildbereichs kann ein neues Schätzbild geschaffen und der Algorithmus erneut durchlaufen werden. Abbildung A.3d zeigt, daß nach 5 Iterationen auch die Störungen im interessierenden Bildbereich gegenüber einer Iteration in Abb. c verringert worden sind. Dieser Effekt läßt sich auch in einer Abnahme der Residuenpunkte erkennen.

Fig. A.4 Das Flußdiagramm des Programms zur Bildrestauration besteht aus 2 Zyklen, wobei die Phase des Referenzbildes und die Amplitudeninformation des zu restaurierenden Bildes im Wechsel eingegeben werden.



Aus den genannten Gründen wird der Algorithmus durch den rechten Teil des Flußdiagramms in Fig. A.4 erweitert. Nachdem im ersten Zyklus die Phase des Referenzbildes neu eingebracht worden ist, wird das Schätzbild in einem zweiten Zyklus mit der Amplitude des zu restaurierenden Bildes kombiniert. Dadurch entfällt auch die Eingabe einer Grundamplitude.

Eine experimentelle Möglichkeit, um das iterative Verfahren in seiner Wirkung darzustellen, ist in Abbildung A.5 a und b untersucht. Dazu wird ein verrauschtes Testbild mit dem unverrauschten Eingangsbild als Phasenreferenz dem iterativen Verfahren unterworfen. Als Ergebnis zeigt sich ein im Rauschen geglättetes Bild. Dieses Resultat weist auf die interpolative Wirkung der vorgestellten Methode hin.

Ein weiteres Experiment zeigt die Anwendungsgrenzen des Verfahrens für Zwecke des Bildalignements. Als Grundlage dient dabei ein Bild, welches in seiner Grauwertverteilung von dem Referenzbild in Abb. A.1 a abweicht. Dazu wurde das obere Drittel des Bildes im Grauwert herabgesetzt (A.5.c). Nach Durchlaufen des iterativen Verfahrens zeigt sich neben dem weitgehenden Erhalt charakteristischer Grauwertinformationen starke vertikale Störungen im rekonstruierten Bild. Diese Störungen sind darauf zurückzuführen, daß durch Änderungen im Grauwertverlauf der Vorlage nicht nur die Amplitudeninformation, sondern auch die Phaseninformation des Bildes geändert worden ist.

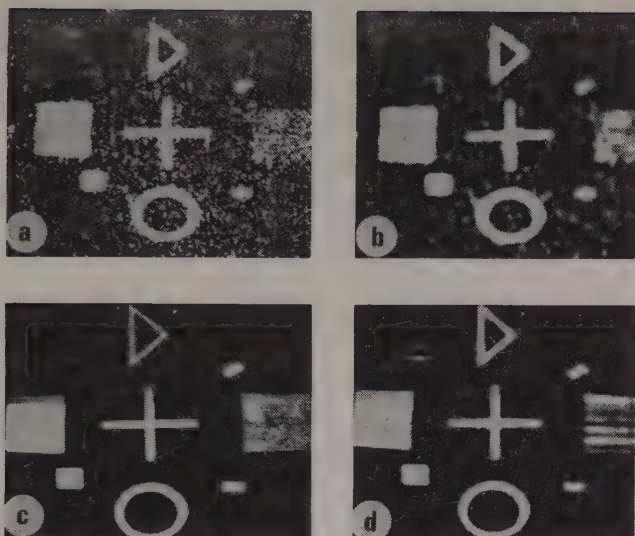


Fig. A 5 Anwendung des iterativen Verfahrens auf ein verrauschtes Testbild (a) mit der Phasenreferenz der unverrauschten Vorlage in Fig. A.1. Das Ergebnis in Abbildung A.5 b zeigt die interpolative Wirkung des Verfahrens im Frequenzraum durch Herabsetzung hoher Ortsfrequenzanteile des Rauschens. Die Anwendung des iterativen Verfahrens auf eine von der Vorlage (Referenz) abweichende Grauwertverteilung zeigt Abbildung A 5 c und d. Dazu wurde die Vorlage aus Fig. A 1 im oberen Drittel im Grauwert herabgesetzt. Die Rekonstruktion zeigt vertikale Störungen, verursacht durch Änderung von Amplitude und Phase bei der Grauwertmanipulation

Zusammenfassend lassen sich zum iterativen Bildalignement unter Berücksichtigung der Phaseninformationen folgende Aussagen machen:

- das Verfahren eignet sich zum Alignement solcher Bilder, die sich nur in ihren Amplitudeninformation unterscheiden (und deren Phase z.B. durch eine nicht ideale Abbildung gestört ist)
- das Verfahren setzt durch Interpolation im Frequenzraum die Auflösung der restaurierten Bilder herab
- je größer die Verschiebung oder Drehung der Bilder zueinander ist, desto stärker ist die notwendige Interpolation und desto weniger eignet sich die Anwendung des Verfahrens.

Die Methode wird zur Überlagerung von gedrehtestreckten Bildern als Vorbereitung einer quantitativen Auswertung polychromatischer, elektronenmikroskopischer Bilder eingesetzt, die diese Bilder unter Nutzung von Phaseninformationen restauriert. Überlagert man entsprechende Bilder auf einem Farbmonitor, z.B. den Scan von 20 KV auf den Rotkanal, 60 KV auf den Grünkanal und 100 KV auf den Blaukanal, so sind andeutungsweise flächenhafte Farbschattierungen zu erkennen. An detailreichen Stellen ist der Farbeindruck durch Farbsäume gestört, hervorgerufen durch eine Bilddrehung zwischen 3-5 Grad und eine Vergrößerung um den Faktor 1.1-1.2 fach zwischen den Bildern. Voraussetzung für eine sinnvolle Auswertung ist damit die exakte Überlagerung der Bilder. Bei Änderung der Beschleunigungsspannung auftretende Verschiebung, Streckung und Drehung der Bilder folgt aus der spannungsabhängigkeit aller Linsen. Hinzu kommt eine Unsymmetrie, die sich aus der starken Verzeichnung der TV-Kamera einerseits und die Abweichung der Achse des Elektronenmikroskops von der Achse der Kamera andererseits bei der Bilddrehung bemerkbar macht.

Die elektronenmikroskopischen Bilder werden bei niedriger Instrumentenvergrößerung aufgenommen. Der Kontrast dieser Bilder beruht damit auf dem Streuabsorptionskontrast, wie in Kapitel III.1 der Arbeit beschrieben. Dieser Kontrast ist abhängig von der Beschleunigungsspannung und ändert nicht die Phase, wenn nicht unter den Bedingungen der Hochauflösung gearbeitet wird. Unterschiede in der Phase der Bilder treten allein durch die Änderung der Abbildungsbedingungen der Optiken bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen auf.

Des weiteren interessieren bei der Auswertung der Farbbilder nur die groben Bildstrukturen. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, daß Aussagen über die elementare Zusammensetzung der Untersuchungsobjekte nur aus Histogrammen getroffen wird (Kap. IV.5).

Zusammenfassend bieten die elektronenmikroskopischen Bilder deshalb jede Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der vorgestellten Methode zum Alignement, da sich 1) die Bilder primär nur in den Amplitudeninformationen unterscheiden und Unterschiede in der Phase auf die nicht idealen Optiken zurückzuführen sind, 2) die Änderungen bezüglich Drehung und Streckung in qualitativ komplex aber in quantitativ geringem Umfang auftreten und 3) die spätere Bildauswertung nur die groben Strukturen betrifft.

Die Durchführung der Bildrestauration auf elektronenmikroskopische Bilder ist in den Abbildungen A6 , A7 und A8 dokumentiert. Dazu werden die Amplituden der bei 20 und 100 KV gewonnenen Bilder mit der Phase des Referenzbildes von 60 KV verknüpft. An der Abnahme der Residuenpunkte bei Durchführung des iterativen Alignements zeigt sich die objektabhängigkeit, da das Verfahren für das 100KV-Bild weniger Punkte als Folge geringerer Drehung und Streckung aufweist als das 20KV-Bild. Abbildung A.7 und die zugehörigen Ausschnittvergrößerungen in Abb.A.8 zeigen den Erhalt charakteristischer Grauwertinformationen unter Beibehaltung der Bildstruktur des Referenzbildes.

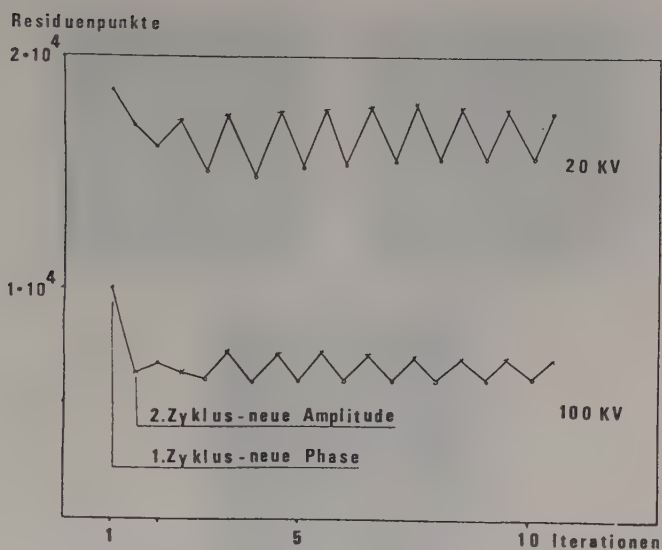


Fig. A.5 Abnahme der Residuenpunkte im Bildrahmen nach Bildrestaurierung eines Bildszene, aufgenommen bei 20 und 100 kV. Das Referenzbild ist die Phase des 60 kV Bildes

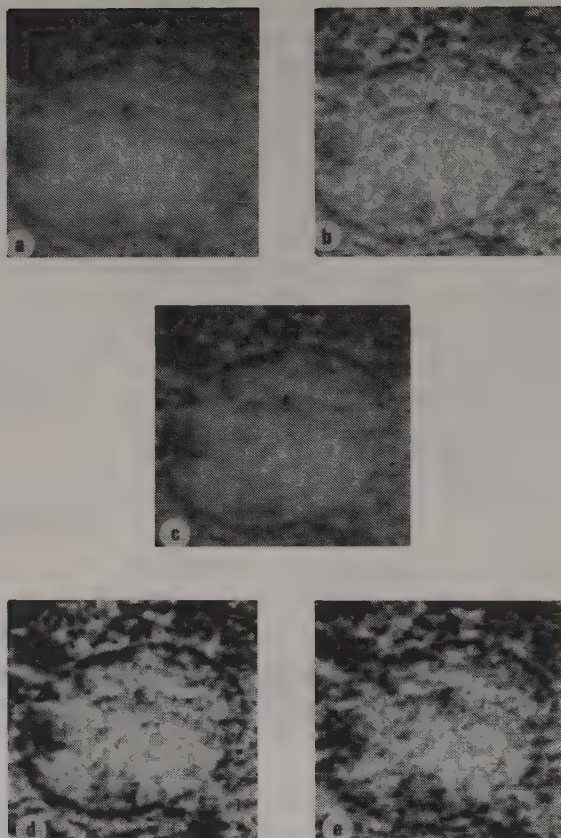


Fig.A.7 Gegeben ist ein Beispiel für die Wirkung des Bild-restaurationsverfahrens. Die Aufnahmen von 20 KV (a) und 100 KV (d) sind in Abbildung b und e mit der Phase aus dem bei 60 KV gewonnenen Bild (b) restauriert

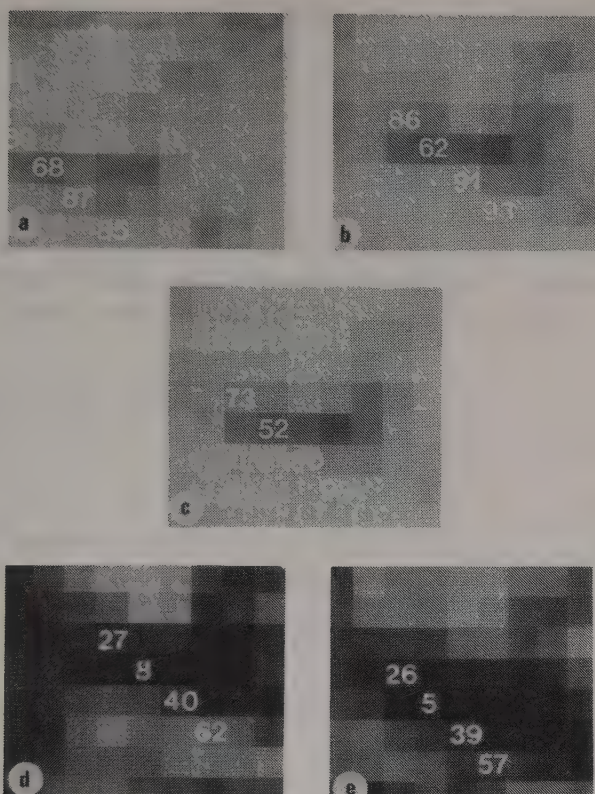


Fig.A.8 Die äquivalent zu Fig. A.7 dargestellten Bildaus-
schnitte zeigen den Erhalt charakteristischer Grau-
wertinformationen und die durch die Phase bestimmte
Bildstruktur

IV.3.7 Zusammenfassung des Teils Bildvorverarbeitung

Die Bildvorverarbeitung wird unter vier methodischen Aspekten diskutiert:

- Bildakkumulation: Sie dient zur Anhebung des Signal-Rausch-Verhältnisses und wird für verschiedene Konfigurationen vergleichend gemessen. Die Verbesserung ist durch Einflüsse im Bildaufnahmesystem nach 200 Akkumulationen gesättigt.
- Verfahren "Noise Cheating": Diese Methode wurde für fotografische Schichten entwickelt und eignet sich zur Vorverarbeitung verrauschter, niederkontrastiger elektronenmikroskopischer Bilder. Mit dem Kriterium Entropie von Koppelfeldern wird der Verlust an Bildinformation bezüglich der Grauwertdynamik abgeschätzt. Die Auflösung wird durch das Verfahren nicht wesentlich beeinflusst.
- Verfahren zur Reduktion ortinvarianter Störungen: Es werden verschiedene Verfahren erprobt, die insbesondere das Empfindlichkeitsmuster des Aufnahmesystems korrigieren.
- Fokuskriterien: Zur Optimierung des Übertragungskanals werden verschiedene digitale Kriterien als Fokuseinstellhilfe on-line am TEM im unteren Vergrößerungsbereich erprobt. Als ein informationstheoretisches Maß findet die Entropie von Koppelfeldern Verwendung, welches ein mit anderen Kriterien vergleichbares Ergebnis erbringt.
- Verfahren zum Bildalignement: Bilder identischer Phase aber unterschiedlicher Amplitude lassen sich, falls sie durch Änderungen in der Abbildung geringfügig gegeneinander gedreht oder versetzt sind, korrigieren. Das iterative Verfahren interpoliert im Frequenzbereich.

IV.4.1 Einleitung

Im allgemeinen wird die flächenhafte Grauwertverteilung mit ihren Regelmäßigkeiten, gegenseitigen Abhängigkeiten und Varianzen innerhalb ausgewählter Bildbereiche als Textur bezeichnet. Durch ihr unterschiedliches Erscheinungsbild läßt sie sich zur Charakterisierung und Klassifizierung einzelner Objekte ausnutzen. Es gibt jedoch keine einheitliche Definition oder einen zugrundeliegenden mathematischen Algorithmus des Begriffes Textur, wodurch man einem bestimmten bildanalytischen Algorithmus den Vorzug geben könnte.

Die Texturanalyse kann Texturen in verschiedenen Ebenen oder Ordnungen bewerten. Die Textur in der ersten Ebene wird ausschließlich durch die Analyse der einzelnen Grauwerte der gegebenen Bildfunktion, z.B. durch eine Histogrammoperation, ermittelt. Texturen in der zweiten Ebene erhält man durch die Betrachtung von Bildpunktgruppen. Hierauf gehen die Anfänge der computergestützten Texturanalyse zurück. "Ad hoc" Definitionen von Hawkins /1970/, Harralick et al. /1973/ und Weszka /1976/ beruhen auf der statistischen Auswertung von Abhängigkeitsmatrizen der Grauwerte nach geometrischen oder semantischen Gesichtspunkten. Es sind auch Versuche unternommen worden, regelmäßige Texturen durch Analyse im Frequenzbereich zu erfassen (in 2.Ordnung identische Texturen haben die gleiche Autokorrelationsfunktion) /Matsuyama et al., 1983/. Texturen in der dritten Ebene werden durch Konturlinien, Verzweigungen und Kantenzüge bewertet. Eine spezielle Methode für die Analyse von unregelmäßigen Zellstrukturen ist von Harms /1982/ entwickelt worden. Das Verfahren besteht aus einer Berechnung örtlicher Gradienten, einem Konturfolgealgorithmus und einer statistischen Bewertung der sich ergebenden Texturlinienabstände. Es sind auch Texturen höherer Ebenen untersucht worden /Foith, 1978/ wobei die Merkmale mit dem Ordnungsgrad steigen.

Das eigentliche Problem liegt im Anwendungsfall jedoch in der Wahl einer geeigneten Methode, die die vorliegende Textur "am besten" beschreibt. Es ist von verschiedenen Autoren angedeutet worden, daß einige der Algorithmen bei geringen Signal-Rausch-Verhältnissen zu keinen sinnvollen Ergebnissen führen. Ein erstes Kriterium, welches sich für die Texturanalyse solcher Bilder eignet, wurde von van Heel /1981/ vorgeschlagen und bewertet als ein Kriterium erster Ordnung die Varianz der Grauwerte im elektronenmikroskopischen Bild.

Die Texturanalyse wird im folgendem aus einem Modell der physiologischen Optik entwickelt. Um im Anwendungsfall relevante Informationen zu erbringen, wird eine informationstheoretische Abschätzung des Strukturgehaltes erläutert, auf die die Bildvorverarbeitung abgestimmt werden kann.

IV.4.2 Aufgabenstellung

Die Randbedingungen und Ziele für eine Texturanalyse an elektronenmikroskopischen Bildern lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Die Aufnahme und Verarbeitung der Bilder erfolgt on-line an einem Transmissionselektronenmikroskop. Zur Bilderfassung werden Low-Light-Level-TV-Kameras eingesetzt, die das auf einem Szintillator abgebildete TEM-Bild abtasten. Die digitalisierten Bilder sind durch verschiedene Einflüsse des Aufnahmesystems gestört. Die Strahlenempfindlichkeit der Objekte erlaubt nur geringe Stromdichten und führt an den empfindlichen Bildaufnahmesystemen neben dem Verstärkerrauschen zur Abbildung des Quantenrauschens (Single-Electron-Noise). Da auch der Kontrastumfang im TEM in der Regel geringer als beim Lichtmikroskop ist, hat dies ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis von nur 20-30 dB zur Folge.

2) Es sollen zytologische Strukturen innerhalb von tumorveränderten Zellkernen analysiert werden. Die Präparate sind mit den üblichen elektronenmikroskopischen Methoden der Fixierung und Schwermetallkontrastierung gefertigt. Die Untersuchung wird auf den unteren elektronenmikroskopischen Vergrößerungsbereich beschränkt, bei dem Änderungen in der Massendicke einen Streuabsorptionskontrast bewirken.

3) Strukturen im Zellkern werden im wesentlichen durch die spezifische Schwermetallanlagerung an die chromosomalen Substanzen im Kern bestimmt. Die Quantifizierung dieser Strukturen und Differenzierung von Veränderungen wäre somit ein wichtiger Parameter zur Untersuchung des Krankheitsbildes im ultrastrukturellen Bereich. Die mathematischen Kriterien sollen mit den Aussagen des menschlichen Beobachters vergleichbar sein.

Durch diese Bedingungen wird die Auswahl gebräuchlicher Algorithmen zur Texturanalyse eingeschränkt. Es hat sich gezeigt, daß sich tumorveränderte Strukturen selten durch Texturunterschiede in der ersten Ordnung auszeichnen, d.h. die Bewertung der Texturen aus ortsunabhängigen Grauerthistogrammen reicht nicht aus. Bekannte Methoden zur Bewertung von Texturen zweiter und höherer Ordnung aus der Analyse der örtlichen Grauwertinformation sind durch das niedrige Signal-Rausch-Verhältnis ausgeschlossen. Auch ein Gradientenverfahren mit einem Konturfolgealgorithmus führt bei geringen Kontrasten und Rauschen zu keinen sinnvollen Aussagen. Zwar läßt sich durch das Setzen von Schwellen eine gewisse Verbesserung erreichen, dadurch wird jedoch die Anzahl der bewerteten Strukturen verringert. Andererseits hat sich die statistische Bewertung der Konturlinien nach Verteilung und-Dichte als sehr effizient für die Beurteilung zytologischer Strukturen erwiesen /Harms, 1982/.

Es liegt nahe, das Prinzip aus Konturendetektion und sich anschließender statistischer Bewertung für eine Texturanalyse an elektronenmikroskopischen Bildern beizubehalten, jedoch der Strategie des visuellen Texturempfindens zu folgen. Dies erscheint insofern sinnvoll, da das visuelle System des Menschen einerseits in der Lage ist, durch adaptives Verhalten auch bei niedrigen Leuchtdichten Strukturen zu erkennen und zu beurteilen, andererseits ist zu erwarten, daß die hieraus abgeleiteten Kriterien mit dem visuellen Empfinden vergleichbar sind.

IV.4.3 Das Modell des visuellen Konturempfindens

Bei der Untersuchung und Beschreibung des visuellen Konturempfindens gibt es zwei sich ergänzende Ansätze, die im folgenden kurz referiert werden sollen.

Der erste, allgemeinere Ansatz, geht von den Kenntnissen der physiologischen Vorgänge bei der Informationsaufnahme auf. Er berücksichtigt die laterale Hemmung in der Retina und die Organisation rezeptiver Felder und den sich daraus ergebenden konturanhebenden Bandpaßcharakter des visuellen Systems. Es lassen sich hieraus Aussagen über diejenigen Bildinhalte ziehen, die bei dem Texturempfinden bewertet werden. Diese als "Primitives" bezeichneten Bildinhalte sind Zero-Crossings, Extrema und Sattelpunkte in der zweiten Ableitung der Bildfunktion /Marr, 1981; Brady, 1982; Watt und Morgan, 1983/.

Der zweite Ansatz versucht an Hand von synthetischen Bildern die Texturwahrnehmung zu untersuchen. Daraus ergibt sich, daß die visuelle Texturwahrnehmung beim unmittelbaren Erkennen im Sinne einer parallelen Verarbeitung in der Lage ist, Texturunterschiede in erster und zweiter Ordnung zu differenzieren. Texturen, die sich nur in der dritten Ordnung unterscheiden, können erst durch genaues Betrachten und Verfolgen der Bildstrukturen im Sinne einer seriellen Verarbeitung erkannt werden. Das visuelle System erkennt und differenziert statistisch in drei verschiedenen Grundelementen (Textons) die Textur: 1) Farbe, 2) Bildsegmente unterschiedlicher Form und Ausdehnung (elongated blobs) und 3) Begrenzungspunkte (terminators) /Julesz, 1975; Julesz, 1981/.

Einige der hier referierten Aussagen über das visuelle Texturempfinden sind von verschiedenen Autoren benutzt worden, um das Texturempfinden des visuellen Systems als Vorbild für ein bildanalytisches Vorgehen zu wählen. Dabei stand bisher die Analyse der Zero-Crossings im Vordergrund /Geuen und Widzowski, 1982; Korn und Schönbein, 1983/. Hierauf aufbauend wird vorgeschlagen, neben den Nulldurchgängen auch weitere charakteristische Punkte in der zweiten Ableitung der Bildfunktion zu einer statistischen Auswertung heranzuziehen, da damit neue Aspekte in eine Texturanalyse eingebracht werden können.

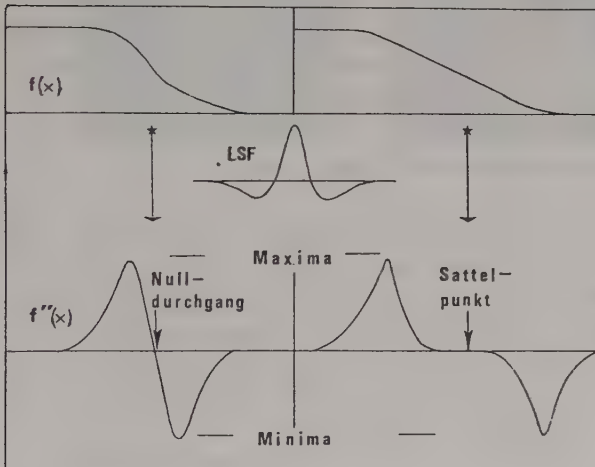
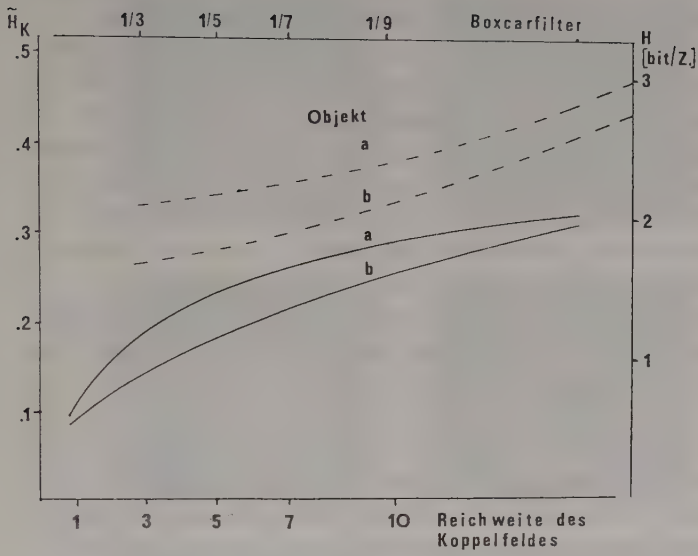
IV.4.4 Realisierung und Eigenschaften der Texturanalyse

Der wesentliche Charakter des visuellen Konturempfindens, die Frequenzfilterung, kann im Rechner durch Differenzbildung zweier unterschiedlich tiefpaßgefilterter Bilder wiedergegeben werden. Die Tiefpaßfilterung kann durch Berechnung übergreifender Mittelwerte oder mit einem Boxcarfilter erfolgen. Nach Subtraktion ähnelt die sich ergebende Punktverbreiterungsfunktion dem "Mexikanischen Hut"-Operator. Der Filter unterdrückt die Nullfrequenz, d.h. er spricht nur auf Änderungen im Grauwertverlauf an.

Um das Übertragungsverhalten verschiedener Filterkombinationen zu untersuchen, wird mit dem Objekt "Kante" die Übertragungsfunktion nach Formel 17 bestimmt. Hieraus läßt sich entnehmen, daß der Minuend der Tiefpaßfilter die Bandbreite und Höhe (Amplitude) des Bandpaßes bestimmt, während der Subtrahend die Ortsfrequenz des Filtermaximums festlegt. Der Vergleich mit der Übertragungsfunktion zeigt, daß der Filter scheinstrukturfrei arbeitet.

Fig.22 Verlauf der aus Koppelfeldern (H_k) und Grauwerthistogrammen (H) nach Bandpaßfilterung ermittelten Entropie zweier Testbilder (Fig.24 c und d)

Fig.23 Faltung (*) einer Linienverbreiterungsfunktion eines Bandpaßes mit zwei unterschiedlichen Kantenverläufen. Zwischen den auf gleicher Höhe normierten Maxima bilden sich Mulldurchgänge aus, bei einer anderen als der Gauß'schen Kantenverwaschung besteht ein Sattelpunkt



Um dieses Filterprinzip unter einem informationstheoretischen Aspekt zu beschreiben, wird die Entropie von Koppelfeldern mit der Entropie des bearbeiteten Bildes verglichen. Es wurden dazu zwei Testbilder gewählt, die sich insbesondere in den groben Bildstrukturen entropiemäßig unterscheiden (Fig.22). Die Entropie aus den Histogrammen der bandpaßgefilterten Bilder zeigt einen qualitativ ähnlichen Verlauf. Dies ist darauf zurückzuführen, daß ein solcher Filter nur auf Änderungen in der örtlichen Grauwertverteilung anspricht, deren Umfang dann durch die Entropie integral über das Bild bewertet wird. Ein hoher Ordnungszustand mit wenigen flächenhaften Kontrasten wird dann, wie auch unter dem Aspekt der Koppelfeldentropie, niedrige Entropiewerte ergeben.

Nach Anwendung der beschriebenen Filterung ergeben als Beispiel die experimentell abgeleiteten Rampenfunktionen in Figur 23. Aus diesen Verläufen werden die Konturen ermittelt, die sich aus den Nullstellen der zweiten Ableitung ergeben. Die Nullstellensuche an den Bildern muß dabei zur Wiedergabe geschlossener Nullstellenverläufe nach Zeilen und Spalten erfolgen. Daraus resultiert z.B. Abb.24c. Es werden diejenigen Nulldurchgänge besonders markiert, die die Eigenschaft eines Sattelpunktes gemäß Figur 23 besitzen. Weiterhin werden auch die Extrema ermittelt. Die detektierten charakteristischen Punkte werden zusammen mit einer Objektmaske in eine Featuremap übertragen und statistisch nach Dichte und Varianz bewertet.

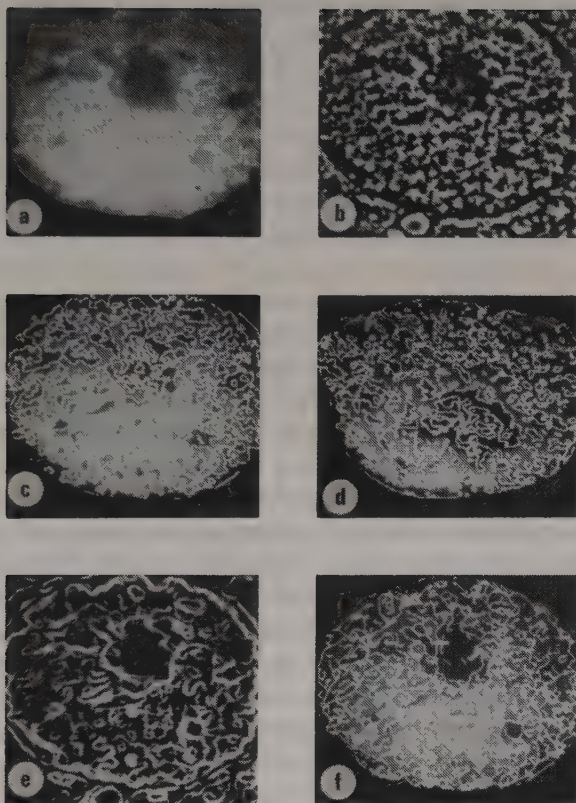


Fig.24 Beispiele für die Texturverarbeitung an Zellkernen. Der Scan eines Zellkerns (a) mit 256×256 Pixeln wird durch die Boxcarfilterkombination $3 \times 3 - 7 \times 7$ Pixel bandpaßgefiltert (b) und nach Texturmerkmalen (Nullstellen) untersucht. Diese sind als Overlay in (c) dargestellt. Zum Vergleich ist ein pathologisch veränderter Zellkern mit einer anderen, gröberen Chromatinstruktur gegeben (d). Der Zellkern aus (a) zeigt nach Gradientenfilterung (e) und nach Anwendung eines Konturfolgealgorithmus (f) ungeschlossene Texturlinien und Doppelkonturen

IV.4.5 Die medizinische Anwendung

Die Texturanalyse wurde bei der Differenzierung pathologisch veränderter Zellkerne der Schilddrüse eingesetzt. Dabei lassen sich neben dem normalen Gewebe (Restparenchym) und den follikulären Adenomen (gutmütiger Tumor) die bösartigen Tumoren follikuläres Karzinom und papilläres Karzinom und einigen Sonderformen (Atypien) unterscheiden. Die Klassifizierung der Neoplasien wird zur Zeit nach den Richtlinien der WHO /Hedinger und Sobin, 1974/ am Lichtmikroskop vorgenommen. Als Kriterium dienen dabei subjektive, histologische Merkmale, wie Follikelbildung papillärer Strukturen oder Kapseldurchbrüche. Die Trefferquote einer richtig gestellten Diagnose liegt zur Zeit bei etwa 75-90%. Es muß gefragt werden, ob die Beurteilung nach zytologischen Kriterien die Diagnose aussagekräftiger machen kann oder in bestimmten Fällen erst ermöglicht. Eine Differenzierung des zytologischen Eindruckes wird in der Literatur als schwierig beurteilt /Löwhagen und Sprenger, 1974; Müller, 1980/. Lang et al. /1978/ schätzen diese Möglichkeit höher ein, jedoch konnten diese Ergebnisse bis heute nicht bestätigt werden. Einfache morphometrische Messungen, wie die Bestimmung des Kernbilddurchmessers, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen /Lang et al., 1977; Schuh et al., 1980; Droese et al., 1981/. Dagegen konnte mit einer hochauflösenden Texturanalyse, die die Chromatinstrukturen des Kernes bewertet, gezeigt werden, daß sich die einzelnen Neoplasien in bestimmten Texturmerkmalen statistisch signifikant unterscheiden.

Zur Verifizierung der Ergebnisse im ultrastrukturellen Bereich wurden 720 Zellkerne von 12 Patienten (jeweils drei Restparenchyme, Adenome, follikuläre und papilläre Karzinome) gemessen. Die zu untersuchenden Präparate wurden nach den elektronenmikroskopischen Standardmethoden gefertigt.

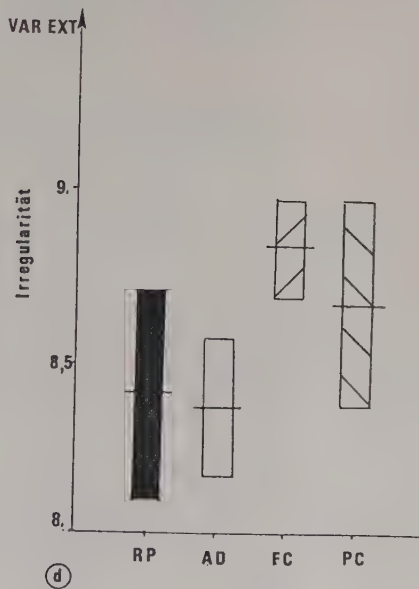
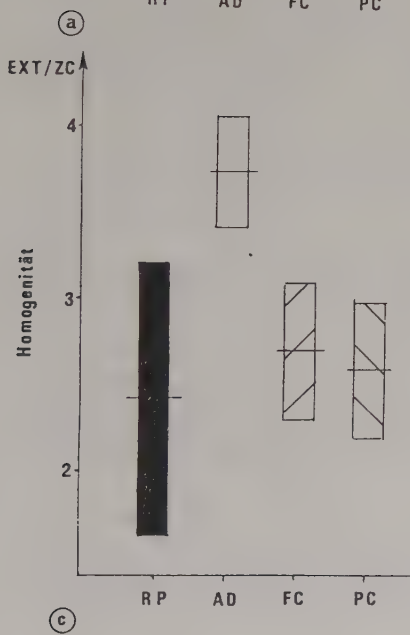
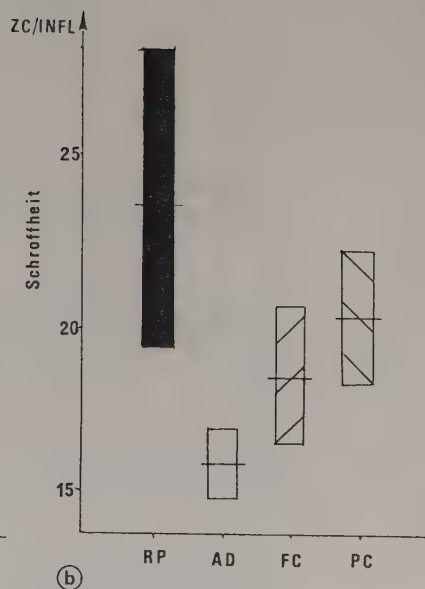
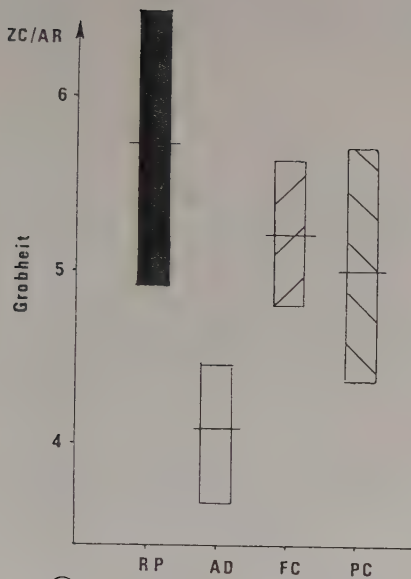
Die Wirksamkeit und Aussagekraft der verwendeten Methode wird an Abbildung 24 erläutert. Dabei wird das Zellkernbild eines Adenoms dem eines papillären Karzinoms gegenübergestellt. Es hat sich für die Aufgabenstellung durch Analyse der Entropie von Kopfeldern in Abbildung 22 erwiesen, daß Boxcarfilter durch die Bewertung grober Bildstrukturen signifikante Differenzen erbringen. In diesem Bereich ist der Ordnungszustand der Kernstrukturen besonders unterschiedlich.

Die detektierten Nulldurchgänge weisen einen überwiegend geschlossenen Verlauf auf. Es werden dabei Gebiete unterschiedlicher Form und Orientierung segmentiert, die sich in einem bestimmten Grauwertumfang auszeichnen und mit dem Begriff des "Textons" vereinbar sind.

Figur 25 zeigt die signifikantesten Ergebnisse aus dem Vergleich der Textur der Restparenchyme (RP), der Adenome (AD) und der Karzinome (FC,PC). Durch das Merkmal der Texturdichte (ZC/AR) wird die Grobheit der Textur bewertet (25 a). Es fallen insbesondere die sehr feinen Texturstrukturen der Adenome auf. Das Auftreten von Sattelpunkten weist auf eine besondere Form des Kantenverlaufs hin. Setzt man diese Punkte in Relation zur Anzahl der Nulldurchgänge (ZC/INFL), so ergibt sich ein Parameter zur Beschreibung der Texturschroffheit (25 b). An glatten Bildstrukturen, wie dem Texturmuster der Adenome, werden viele, an dem schroffen, treppenförmigen Chromatinaufbau des normalen Gewebes relativ wenige Sattelpunkte registriert. Die Relation aus der Anzahl der Extrema zu den Nulldurchgängen (EXT/ZC) ermöglicht eine Beurteilung der Homogenität der Chromatinstruktur (25 c). Die Dichten der bewerteten Nulldurchgänge und Extrema zeigen eine Ähnlichkeit, da zwischen einem Minimum und Maximum ein Nulldurchgang besteht. Der Vergleich der Varianzen (VAR EXT) kann jedoch abweichende Ergebnisse erbringen, da individuelle Schwankungen im Strukturaufbau der Bilder auftreten (25 d).

Für eine automatisierte Differenzierung ist insbesondere die Trennung von gut- und bösartigem Gewebe von Bedeutung. Für die hier gemachten Untersuchungen ergibt der Student's t-Test zwischen den Merkmalen der Adenome und Karzinome Signifikanzen besser als 5%. Dagegen sind die Ergebnisse aus der Messung der Zellkernfläche und der Form nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Die Ergebnisse korrelieren qualitativ mit ähnlichen Erhebungen am Lichtmikroskop, bei denen die Textur auf der Basis eines Gradientenverfahrens an Schnitten und Ausstrichen der Schilddrüse bewertet wurde /Kriete,A.; Romen,W.; Schäffer,R.; Harms,H.; Haucke,M.; Gerlach,B.; Aus,H.M.; ter Meulen,V.,1983 und Kriete,A.; Schäffer,R.; Harms,H.; Aus,H.M.,1985/.

Fig.25 Ergebnis der Texturmessung von 750 Zellkernen der Schilddrüse. Verglichen werden normales Gewebe (Restparenchym-RP), Adenome (AD), follikuläre Carcinome (FC) und papilläre Carcinome (PC). Gegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung



IV.4.6 Zusammenfassung des strukturell-analytischen Teils

Für elektronenmikroskopische Bilder wurde eine neue Methodik zum Erhalt von Texturlinien entwickelt und erprobt, die sich für eine statistische Analyse eignet:

- an licht- und insbesondere elektronenmikroskopischen Bildern lassen sich Neoplasien der Schilddrüse signifikant differenzieren
- das Verfahren hat ein Modell des "Visual Perception" zum Vorbild und korreliert mit der Beurteilung von Texturen durch den menschlichen Beobachter
- das Verfahren benutzt Boxcar-Filter unterschiedlicher Größe und detektiert charakteristische Punkte wie Zero-Crossings, Sattelpunkte und Extrema
- der Algorithmus eignet sich insbesondere für kleinere Imageprozessoren und läßt eine Anpassung an Aufgabenstellung und Bildqualität zu
- die Nulldurchgänge zeigen einen geschlossenen Verlauf
- durch Verzicht auf das Setzen von Schwellenwerten können auch solche Strukturen bewertet werden, die mit schwacher Amplitude in besonders hellen oder dunklen Bereichen des Bildes auftreten (Bspl. Nukleolus)
- Die bandpaßförmige Filterung der zu untersuchenden Strukturen zeigt eine Ähnlichkeit zur Koppelfeldentropie, da Grauwertübergänge und Ordnungszustände bewertet werden.

IV.5.1 Einleitung

Neben der Bestimmung der Massendicke interessieren in der Elektronenmikroskopie mehr und mehr auch analytische Fragestellungen, die zur Entwicklung der Röntgenmikroanalyse und Energieverlustspektroskopie geführt haben. Die hier beschriebene Methode lehnt sich an ein Verfahren zur polychromatischen Radiologie an, bei der zur stofflich selektiven Detailwiedergabe neben der reinen Helligkeitsmodulation der Röntgenstrahlung auf Grund von Absorption auch diejenige Information ausgenutzt wird, die eine andere Wellenlänge der Röntgenstrahlung beim Weg durch das zu untersuchende Material mitbringt /Backmund und Boseck, 1969/. Ziel der zu entwickelnden polychromatischen, elektronenmikroskopischen Methode soll es sein, neben der Aussage über die Massendickenverteilung eine Abschätzung der relativen Elementzusammensetzung an kontrastierten biologischen Dünnschnitten im unteren Vergrößerungsbereich zu erbringen.

Zusammenfassend werden folgende Annahmen zur Abschätzung relativer Elementzusammensetzungen durch eine polychromatische Methodik gemacht:

- 1) als Untersuchungsobjekte dienen schwermetallfixierte biologische Dünnschnitte,
- 2) die elektronenoptische Vergrößerung ist maximal 5000fach,
- 3) es wird eine konstante Präparatdicke und eine Lageunabhängigkeit der Elemente vorausgesetzt.

IV.5.2 Realisierung des polychromatischen Bildes

Der Bildkontrast des elektronenmikroskopischen Bildes läßt sich durch die Beschleunigungsspannung entscheidend beeinflussen. Die Änderungen sollen bei den Beschleunigungsspannungen 20, 60 und 100 kV, nach Formel 1 de Broglie Wellenlängen von 0.0085, 0.0049 und 0.0038 Nanometern entsprechend, untersucht werden. Zur Bild-erfassung wird ausschließlich die LLL-TV-Kamera benutzt, da diese in der Empfindlichkeit und Kontrastwiedergabe den anderen Konfi-gurationen überlegen ist. Die Änderung der Beschleunigungs-spannung bewirkt auch eine Änderung der Abbildungseigenschaften des TEMs in Bezug auf den Vergrößerungsfarbfehler. Beim Übergang von 60 nach 20 kV ist neben einer Bilddrehung eine Bildverkleine-rung von 8% zu registrieren. Zur Vorverarbeitung der Bilder wird eine Bildrestauration unter der Berücksichtigung der Bildphase nach einem im Anhang unter Kapitel IV.3.6 beschriebenen iterativen Verfahren durchgeführt. Als weiterer Schritt wird eine Korrektur der nichtlinearen Verstärkerkennlinie nach Formel 36 vorge-nommen.

Zur Beschreibung der Bildkontraständerung wird an einem schwermetallfixierten biologischen Objekt das Strukturspektrum, nach Abgleich der Aufnahmen auf die gleiche mittlere Helligkeit, gemessen. Dazu sind in Figur 26 a die aus 128 Bildzeilen gemit-telten und auf die Nullfrequenz normierten Werte wiedergegeben. Damit liegt ein lineares Energiedichtespektrum vor, das den direkten Strukturvergleich erleichtert und die Korrektur des Bandpaßes des Aufnahmesystems zuläßt (Bahner, 1976).

Informationstheoretisch kann die Änderung im Bildkontrast auch durch die Entropie von Koppelfeldern beschrieben werden (Glei-chung 10). Dabei zeigt sich in Abbildung 26 b ein charakteristi-scher, nach Fig. 26 a nicht allein durch die MTF des Bilderfas-sungssystems verursachter Anstieg zu großen Koppelfeldern (nie-drigen Ortsfrequenzen). Die Änderung im Kontrast fällt im Über-gang von 20 nach 60 KV, wie in Fig. 26 a, stärker aus als im Übergang von 60 nach 100 kV.

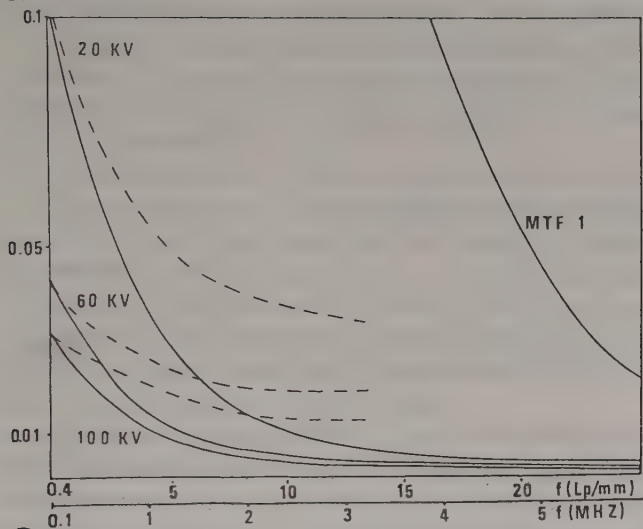
Die Kontraständerung läßt sich auch theoretisch berechnen und nach einem Vorschlag von Dorstens /1971/ als Modulationskontrast in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung angeben. Figur 26 b zeigt den Verlauf für die Elemente Kohlenstoff (C) und Osmium (Os), berechnet für eine Massendicke $3.01 \cdot 10^{-10} \text{ g/cm}^2$ nach den Formeln 2-6 dieser Arbeit.

Die bei der Änderung der Beschleunigungsspannung auftretenden Variationen bezüglich des Kontrastes, experimentell durch den Strukturinhalt und die Entropie ermittelt und theoretisch durch den Modulationskontrast errechnet, deuten informationstheoretisch auf nicht redundante Informationen zwischen den Bildern hin.

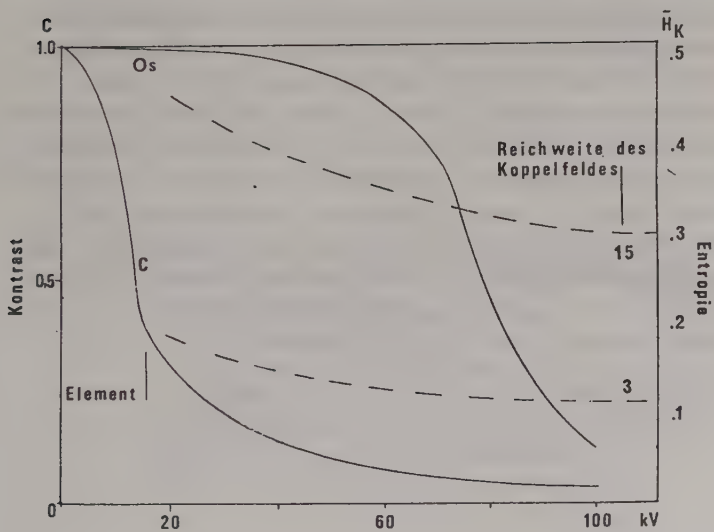
In Anlehnung an die Farbfernsehtechnik können die Einzelbilder auf einem Farbmonitor überlagert und unter Gesichtspunkten der Farbanalyse vergleichend ausgewertet werden. Das Bild bei 20 kV wird dazu auf den Rotkanal, das Bild von 60 kV auf den Grünkanal und das Bild von 100 kV auf den Blaukanal übertragen. Es wird zunächst die Transformation der Farbbilder in ein Luminanz-, Chrominanz-System durchgeführt, wobei das UYV-System gewählt, da dieses eine fernsehtechnische Darstellung der Leuchtdichten und Farbwerte zuläßt. Die Kodierung der Chrominanz wird durch die Differenzfarbwerte U und V vorgenommen, das Luminanzsignal Y kann gradationsrichtig die Leuchtdichte auf einem Schwarzweiß-Monitor darstellen.

Fig.26 Gemessener Verlauf der Strukturinhalte (a), gemessene Entropie und berechneter Kontrast (b) bei Variation der Beschleunigungsspannung. Dargestellt sind die auf 1 normierten Strukturspektren eines biologischen Schnittes (a) für verschiedene Beschleunigungsspannungen im Bereich 0.4 bis 25 Lp/mm. Die gestrichelten Kurven zeigen die Entfaltung mit der MTF des Bildaufnahmesystems. Der sich bei abnehmender Beschleunigungsspannung erhöhende Bildkontrast führt zu höheren Entropiewerten (Hz), als Folge der MTF insbesondere im Bereich großer Koppelfelder (b). Die Kontraständerung läßt sich auch theoretisch berechnen und ist für zwei Elemente (C,Os) als Modulationskontrast C dargestellt.

Strukturinhalt



a



b

Zur Transformation der RGB-Intensitäten in das UVY-System gilt /Lang, 1978/ :

$$\begin{aligned} U &= -0.147 R - 0.289 G + 0.436 B \\ V &= 0.615 R - 0.514 G - 0.101 B \\ Y &= 0.299 R + 0.587 G + 0.114 B \end{aligned} \quad (43)$$

Hieraus läßt sich der Chrominanzvektor A und der Farbwinkel $\text{tg } \varphi$ gegen die U-Achse definieren:

$$\frac{A}{C} = \frac{U^2 + V^2}{C^2} \quad (44)$$

$$\text{tg } \varphi = \frac{V}{U} \quad (45)$$

Um die Aussagemöglichkeit der Bildkombination zu untersuchen, wurde der Bildkontrast und die sich ergebenden Farbwerte für verschiedene Massendicken, verschiedene Elemente und Aperturwinkel theoretisch berechnet.

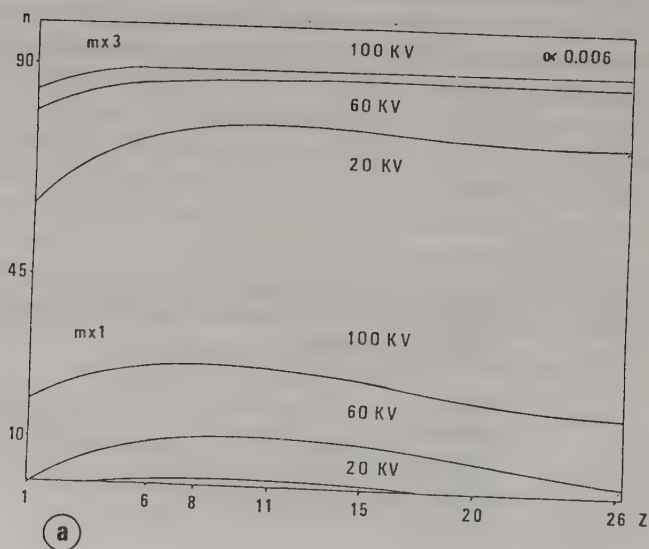
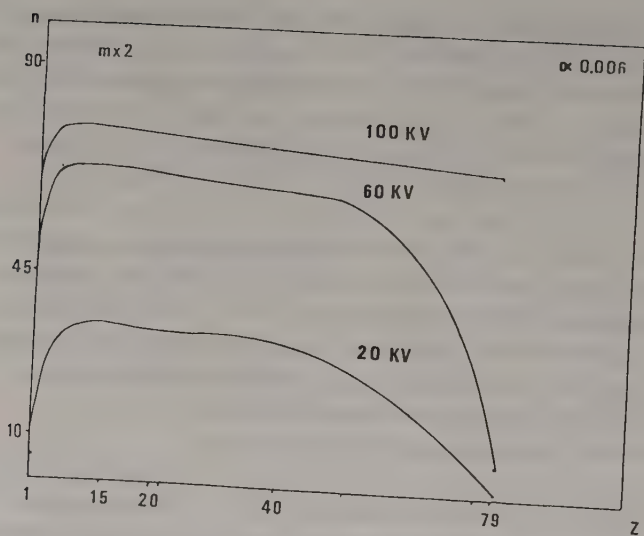
Der Streuabsorptionskontrast wurde für die Kontrastblenden 30 und 90 μm mit dem Aperturwinkeln 0.006 und 0.018 gerechnet (Brennweite des EM-Objektives 2.5 mm). Um gegenüber den experimentellen Gegebenheiten vergleichbare theoretische Ergebnisse zu erhalten wurde mit solchen Massendicken gerechnet, die einen meßbaren Kontrast erzeugen. Deshalb wurde eine Leuchtdichte von 10^{-10} A/cm^2 bestimmt, die einem N_0 von 90 Strahlelektronen/ Bildpunkt bei 2000facher Vergrößerung entspricht. Bei einer typischen Dicke von 70 nm für biologische Ultradünnschnitte wurden drei Massendicken m_x (g/cm^2) von $m_{x1}=6 \cdot 10^{-11}$, $m_{x2}=3.01 \cdot 10^{-10}$ und $m_{x3}=2.66 \cdot 10^{-9}$ angenommen. Mit Hilfe der Avogadro-Konstante ergibt sich die mit steigender Atommasse abfallende Anzahl von Einzelatomen zum Erhalt einer konstanten Massendicke.

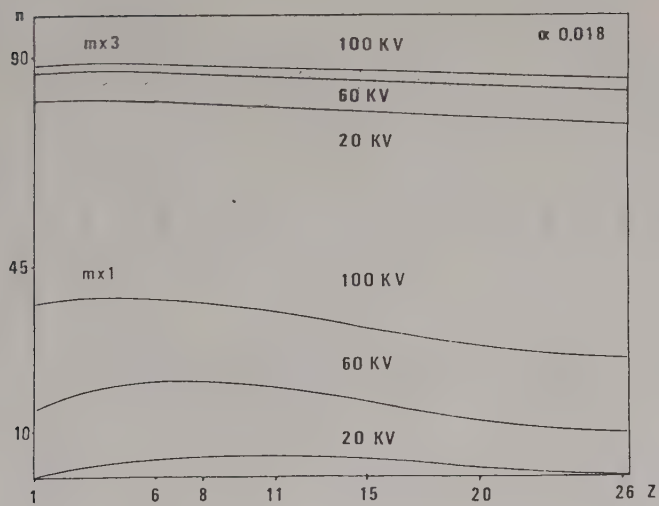
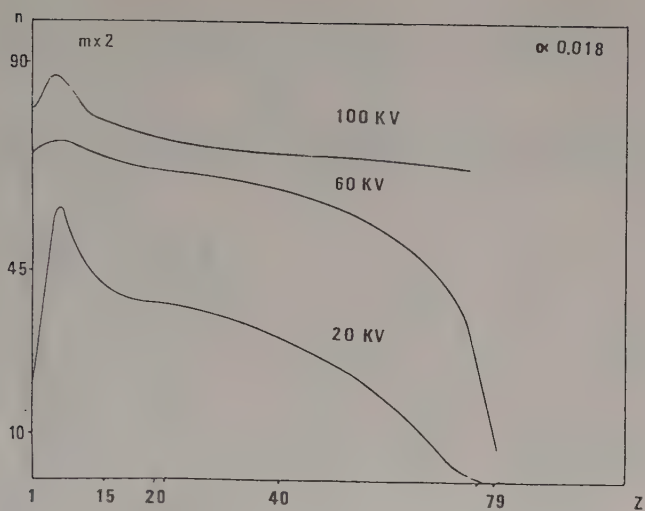
Nach Berechnung der elastischen und inelastischen Streuquerschnitte nach den Formeln 2 und 3 erfolgt die Berechnung der Kontraste mit Formel 6. Die entsprechenden Ergebnisse zeigt für die Apertur 0.006 Figur 27a mit mx_2 oben und mx_1, mx_3 unten. Im Vergleich dazu ergibt sich ein Kontrastverlauf für die Apertur 0.018 in Abbildung 27b.

Die Anzahl der inelastisch gestreuten Elektronen übersteigt die Anzahl der elastisch gestreuten nur für Elemente mit niedriger Ordnungszahl (Lenzsche Regel, Formel 4). Da jedoch nur kleine Streuwinkel für die inelastisch gestreuten Elektronen vorliegen, ist nur bei kleinen Aperturen und niedrigen Ordnungszahlen erkennbar. Der überwiegende Kontrastverlauf wird durch die elastisch gestreuten Elektronen verursacht.

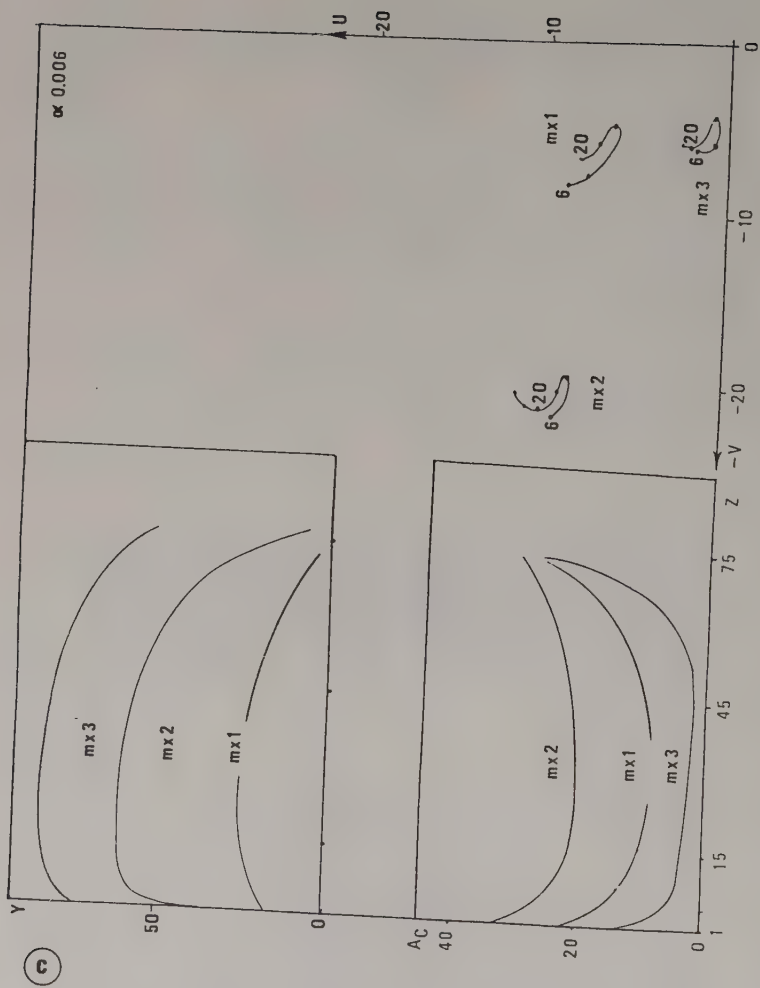
Es erfolgt dann die Berechnung der Farbwerte für die beiden Aperturwinkel, gegeben in Fig. 27 c und d. Es ist eine Übereinstimmung des Farbwinkels φ mit dem Experiment feststellbar (z.B. in Fig. 29 b), der sich als von der Massendicke unabhängig erweist. Die Größe des Chrominanzvektors zeigt einen uneinheitlichen Verlauf, insbesondere bei dem Vergleich verschiedener Massendicken.

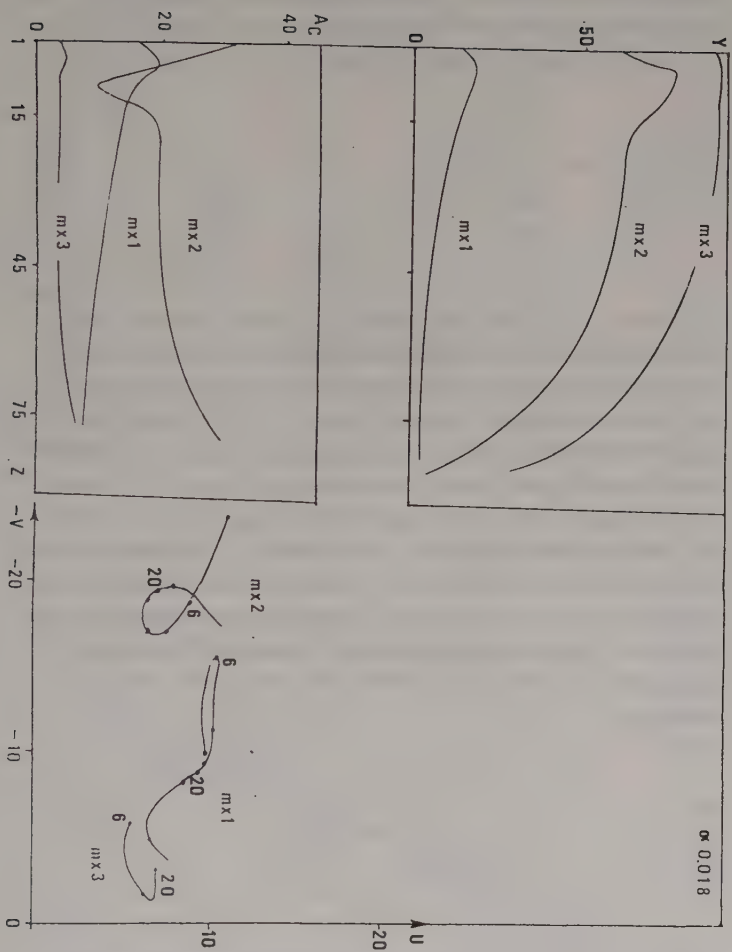
- Fig. 27 a Verlauf des Streuabsorptionskontrastes für drei Massendicken bei der Apertur 0.006 in Abhängigkeit von der Ordnungszahl
- b Wie Fig. 27 a, Apertur jedoch 0.018
- c Ergebnisse der Farbanalyse der Werte aus Fig. 27 a verknüpft als R (20 kV), G (60 kV) und B (100 kV). Gegeben sind neben dem IIV-Diagramm, welches Werte im grünblauen Bereich anzeigt, die Luminanzen V und die Beträge des Chrominanzvektors A
- d Wie in 27 c, Wertevorrat jedoch aus 27 b





(b)





(d)

Es ist von Interesse, aus dem Verlauf der Luminanzen und Chrominanzen weiterführende Auswertungen in Hinsicht auf die Massendickeverteilung und Elementzusammensetzung durchzuführen. Die aus den theoretischen Rechnungen empirisch abgeleitete Funktion zur Berechnung der Massendicke ist:

$$\frac{N_0 - Y_1}{\sqrt{\frac{A}{C_1}}} \cdot \ln c = \frac{N_0 - Y_2}{\sqrt{\frac{A}{C_2}}} = mx_2 \quad c = \frac{mx_2}{mx_1} \quad (46)$$

Es ergeben sich an Hand des Beispielles absolute Massendicken. Das Verfahren nutzt dabei die Gegenläufigkeit von Chrominanzvektor und Luminanzwert aus, wobei durch den Maximalwert N_0 , der der Anzahl der Strahlelektronen entspricht, eine Normierung durchgeführt wird. Die nach dieser Beziehung berechneten Massendicken zeigen eine gute Verwendungsmöglichkeit für einen breiten Ordnungszahlenbereich; bei großem Aperturwinkel weicht die errechnete Massendicke zu hohen Ordnungszahlen vom proportionalen Verlauf ab (Figur 28 a). Unter den angenommenen Bedingungen kann aus der Kenntnis der Massendicke eine Korrektur dergestalt erfolgen, daß eine Relation in Bezug auf Kohlenstoff ($C=6$) durch eine empirisch abgeleitete Formel ermittelt werden kann:

$$Y_1 = N_0 - \left[\frac{(N_0 - Y_2) \cdot A}{\sqrt{\frac{A}{C_1}}} \right] \frac{mx_2}{mx_1} \quad (47)$$

Diese Beziehung wird für die Apertur 0.006 angewandt und zeigt im Bereich hoher Ordnungszahlen einen Gang mit Z ; der Einfluß der Massendicke ist weitgehend korrigiert (Figur 28 b).

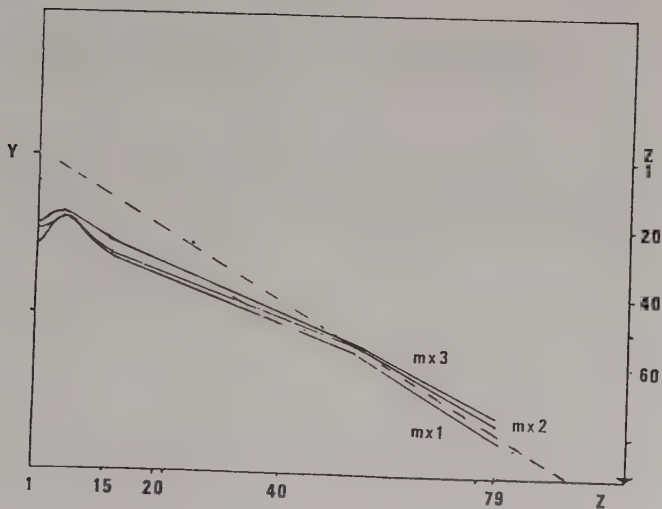
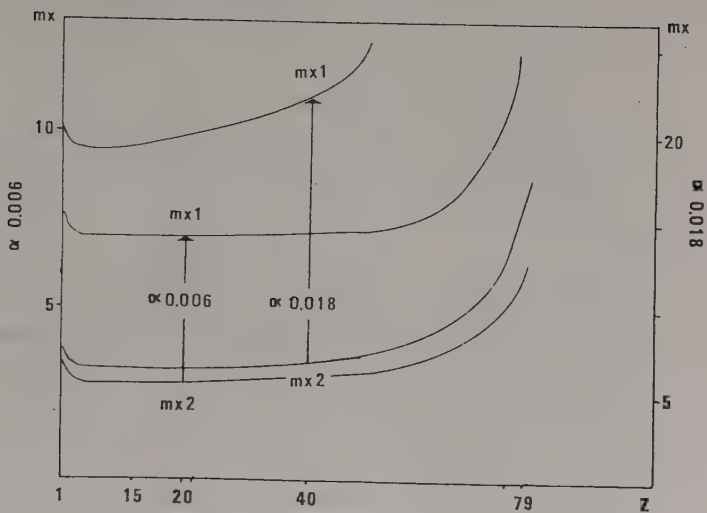


Fig. 28 a Ergebnisse der Massendickenberechnung für zwei Massendicken und Aperturen. Die Farbanalyse zeigt die angestrebte Unabhängigkeit von der Z-Zusammensetzung
 b Die Analyse bezüglich der Elementzusammensetzung zeigt eine angenäherte Unabhängigkeit von der Massendicke

IV.5.3 Anwendung der polychromatischen Methode auf biologische Dünnschnitte

Das auf Grund theoretischer Überlegungen entwickelte Verfahren wurde an mit Schwermetall kontrastierten Ultradünnschnitten erprobt. Als Standardeinbettung hat sich die Doppelfixierung bewährt. Dabei wird zunächst mit Glutaraldehyd (4 Stunden in 2% Lösung) fixiert, wodurch durch Vernetzen der Proteine die Zellstruktur stabilisiert wird. Es wird dabei mit einem gepufferten Niveau gearbeitet, da die Zellen osmotisch empfindlich sind. Es folgt eine Fixierung mit Osmiumtetroxid (2 Stunden in 1% Lösung), die zur Fixierung von Phospholipiden beiträgt und einen elektronenoptischen Kontrast hervorruft. Nach Einbettung in Vestopal und Aufbringung auf Polioform-Trägerfolie und Ultradünnschnitt bieten sich als Kontrastierung Bleicarbonat oder Uranylacetat an. Diese Kontrastierungsmittel können die Feinstruktur zu diesem Zeitpunkt nicht mehr verändern.

Es werden im folgenden drei verschieden fixierte und kontrastierte Schnittpräparate der Schilddrüse untersucht:

- 1) Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid
- 2) gleiche Fixierung wie 1) und Kontrastierung mit Bleicarbonat
- 3) gleiche Fixierung wie 1) und Kontrastierung mit Bleicarbonat und Uranylacetat

Fig. 29 zeigt die Ergebnisse eines ausschließlich mit Osmium fixierten Präparates. Durch den geringen Kontrast wurde die Hellfeldaufnahme (a) und die zugehörigen nachfolgenden Aufnahmen zur besseren Wiedergabe digital im Kontrast verstärkt. Das Chrominanzsignal zeigt eine geringe Ausprägung im grünblauen Bereich (b). Durch Anwendung der Formeln 46 und 47 ergeben sich die Bilder für die Massendickenverteilung (c) und die relative Elementzusammensetzung (d). Das zugehörige logarithmierte Histogramm (e) zeigt das Maximum der Verteilung um den Wert $Z=10$.

Dieses Spektrum läßt sich in Hinsicht auf die relative Anzahl der vorkommenden Atome bewerten, sofern das Kontrastierungsmittel bekannt ist. Der mittlere Wert der Ordnungszahl setzt sich zusammen aus (wobei auf Kohlenstoff $Z_1=6$ normiert wird):

$$\bar{Z} = \frac{1}{\sum_{N_1 \dots i} N_i} \sum_{i=1}^Z N_i Z_i + N_2 Z_2 \dots N_i Z_i \quad (48)$$

Hieraus läßt sich die Anzahl N_x der Atome bestimmen, auf die jeweils ein Schwermetallatom (Z_2) kommt:

$$N_x = \frac{N_2}{N_1} = \frac{\bar{Z} - Z_1}{Z_2 - \bar{Z}} \quad (49)$$

Unter der Annahme, daß das biologische Präparat im wesentlichen aus Kohlenstoff besteht, ergibt sich eine Anlagerung von einem Osmiumatom auf 16 Kohlenstoffatome.

Äquivalent dazu wird ein mit Osmium und Bleikarbonat kontrastierter Schnitt ausgewertet. Der Verlauf des Kontrastes in Abbildung 30 weist auf ein mittleres $\bar{Z}$ von etwa 22 hin. Hieraus läßt sich abschätzen, daß etwa 1 Bleiatom auf 5 Atome des Kohlenstoff-Osmium-Gemisches des vorigen Beispiels eingelagert wird. Eine vergleichbare Abschätzung ist bei Reimer /1967/ zu finden.

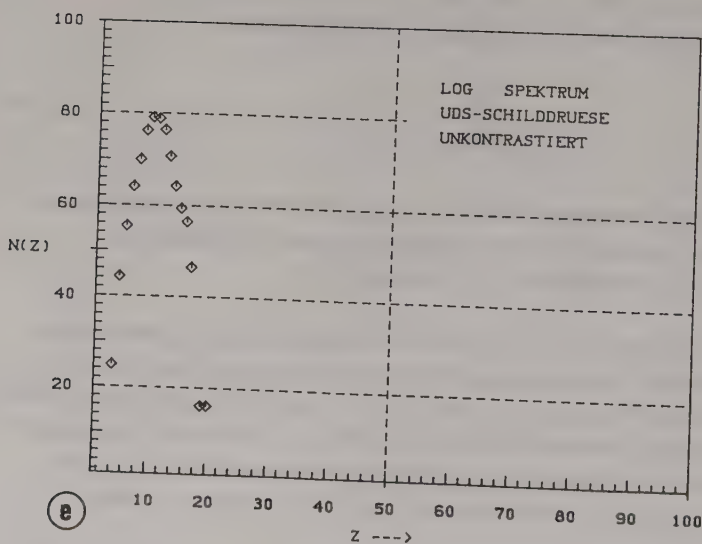
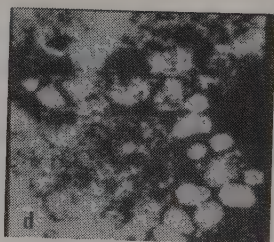
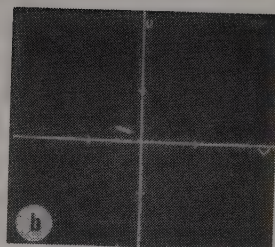
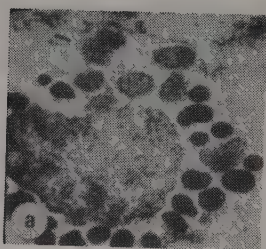


Fig.29 Anwendung der polychromatischen Methode auf einen Zellkern, kontrastiert mit Osmium. Der geringe Kontrast im Bild erfordert eine Kontrastverstärkung (a). Es ergeben sich in Übereinstimmung mit theoretischen Berechnungen Werte im grünblauen Bereich des Farbdigrams (b). Zwischen der Massendicken und Elementverteilung besteht ein enger Zusammenhang (c,d). Durch Histogrammoperation von (d) und Logarithmieren ergibt sich das Verteilungsspektrum (e).

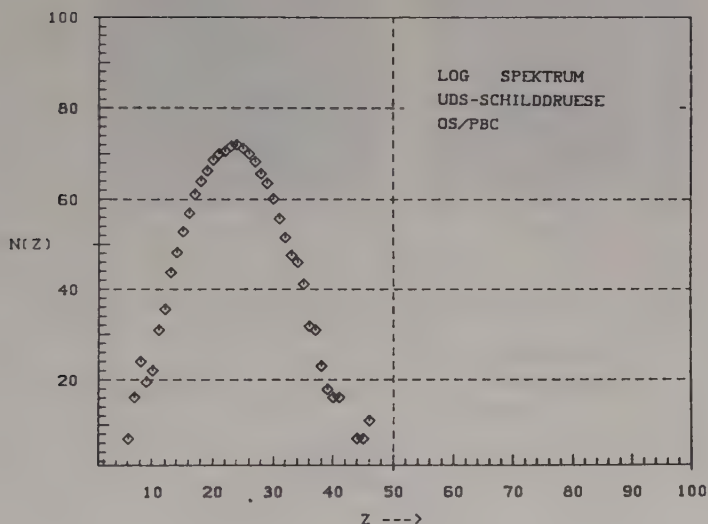
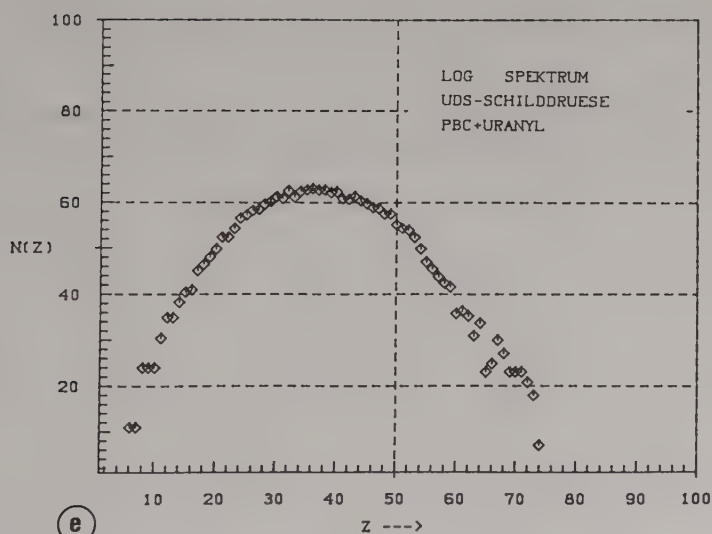
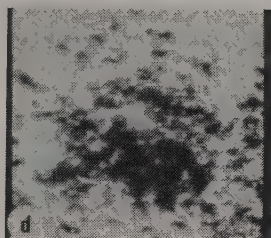
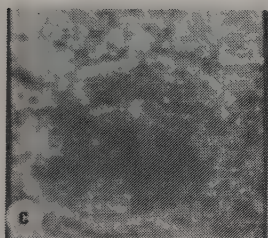
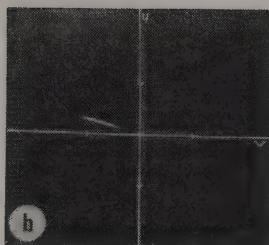
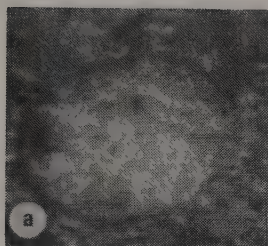


Fig.30 Verteilungsspektrum eines mit Osmium und Blei-karbonat kontrastierten Zellkernes

Als letztes Beispiel wird ein mit Osmium, Bleicarbonat und Uranylacetat kontrastierter Schnitt nach der Mehrstrahltechnik ausgewertet (Fig.31). Das Chrominanzsignal (b) zeigt eine stärkere Ausprägung gegenüber dem allein mit Osmium kontrastierten Schnitt in Abbildung 29. Der Massendickenverlauf (c) und die Informationen über die Verteilung der Ordnungszahlen weisen erhöhte Werte auf. Berechnet man die zur Bildung einer mittleren Ordnungszahl von $Z=35$ notwendige Anzahl von Uranatomen, so kommt man zu dem Verhältnis von einem Uranatom auf 2 Kohlenstoffatome.

Fig.31 Ergebnisse der Farbanalyse an einem mit Osmium, Bleicarbonat und Uranylacetat kontrastierten Zellkernes (a), (b) zeigt im Vergleich zu Fig.29b durch die höhere Massendicke (c) auch eine stärkere Ausprägung des Chrominanzvektors. Die Elementzusammensetzung in (d) und das Verteilungsspektrum (e) weisen auf einen breiteren Umfang in der Elementverteilung des Präparates als in Fig.29 und Fig.30 hin



IV.5.4 Durchführung und Auswertung von Messungen an einem CTEM mit Rasterzusatz

Zum Vergleich der am TEM gewonnenen Ergebnisse wurden Messungen an einem TEM 420 (Philips, Eindhoven) mit Rasterzusatz durchgeführt. Dieses Gerät ist neben dem Hell- und Dunkelfeldringdetektor mit einem Halbleiter-Backscatterdetektor, einem EDX-System von EDAX und einem Energieverlustspektrometer (Modell 607, Gatan, Warrendale) ausgerüstet. Die Signale werden auf Polaroid Negativ-Positivmaterial aufgezeichnet. Für hier durchgeführte quantitative Messungen wurde die Regelung für Verstärkung und Kontrastwiedergabe nicht verändert.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Negative auf einem Leuchtschirm im Durchlicht mittels einer TV-Kamera gescannt und mit der unter IV.1 beschriebenen Anlage weiterverarbeitet.

Zur Feststellung der Kontrastwiedergabe wurde eine vom Graustufengenerator erzeugte 10stufige Grautreppe aufgezeichnet. Es ergab sich nach Digitalisierung ein lineares Verhalten im Bereich mittlerer Grauwerte.

Zusätzlich zu diesen bildanalytischen Messungen wurde an den gleichen Präparaten eine Röntgenmikroanalyse durchgeführt.

IV.5.4.1 Das STEM-Backscattersignal

Das Backscattersignal, das sich aus der Detektion der Rückstreu-elektronen mittels Halbleiterdetektoren ergibt, kann aus einer Vielzahl von Kontrastentstehungsmechanismen, wie den topografischen oder magnetischen Eigenschaften der Probe, entstehen. An biologischen Dünnschnittpräparaten ist jedoch der Materialkontrast wesentlich, da die Winkelinflüsse zwischen Probe und einfallendem Strahl weitgehend ausgeschlossen werden. Dies ist durch die relativ glatte Schnittoberfläche und einen Winkel von 0-10 Grad zwischen Probe und einfallendem Strahl gewährleistet. Dadurch wird das Maximum der keulenförmigen Rückstrahlcharakteristik, abhängig von freier Weglänge, Zahl der Streuprozesse und Materialeigenschaften, erfaßt.

Der Rückstrahlkoeffizient verhält sich nach Niedrig /1982/ proportional zur Anzahl der Atome, der Präparatdichte und Dicke; er kann auch aus theoretischen Monte Carlo Berechnungen abgeleitet werden. Experimentelle Ergebnisse zeigen bei hohen Beschleunigungsspannungen auch bei hohen Massendicken einen proportionalen Verlauf, da sich dann Mehrfachstreuprozesse weniger bemerkbar machen /Reimer, 1983/.

Für Materialgemische läßt sich der Rückstreuoeffizient n nach der Castaing-Formel voraussagen

$$n = \sum c_i n_i \quad (50)$$

wobei c_i die Massenkonzentration und n_i der Backscatterkoeffizient der reinen Elemente ist.

Zur Untersuchung wird ein mit Osmium und Blei kontrastierter Schnitt herangezogen. Abbildung 32b zeigt das Backscattersignal der zugehörigen STEM-Aufnahme in (a). Die Vergrößerung am STEM beträgt 12500fach und die Beschleunigungsspannung 120 kV. Der gleiche Objektausschnitt wird danach am TEM mit der polychromatischen Technik ausgewertet. Durch die starke Nachvergrößerung der Faserplatten/Restlichtverstärkerkonfiguration war eine Vergrößerung am TEM von 2000fach ausreichend. Abbildung 32d zeigt den Massendickenverlauf und das zugehörige Z-Spektrum (e). Dabei ergibt sich in Hinsicht auf den Massendickenverlauf eine qualitativ sehr gute Übereinstimmung beider Methoden. Dies ist im wesentlichen auf die Tatsache zurückzuführen, daß der Rückstrahlkoeffizient des Backscattersignals weitgehend von Z unabhängig, sondern eher nach Formel 50 von der Massendicke abhängt.

Dieses Verhalten wird nochmal in der folgenden Abbildungen 33 deutlich, bei denen aus dem Histogramm der Filmnegative der Kontrastumfang des Backscattersignals eines mit Osmium und Blei und eines ausschließlich mit Osmium kontrastierten Bildausschnittes abgelesen werden kann.

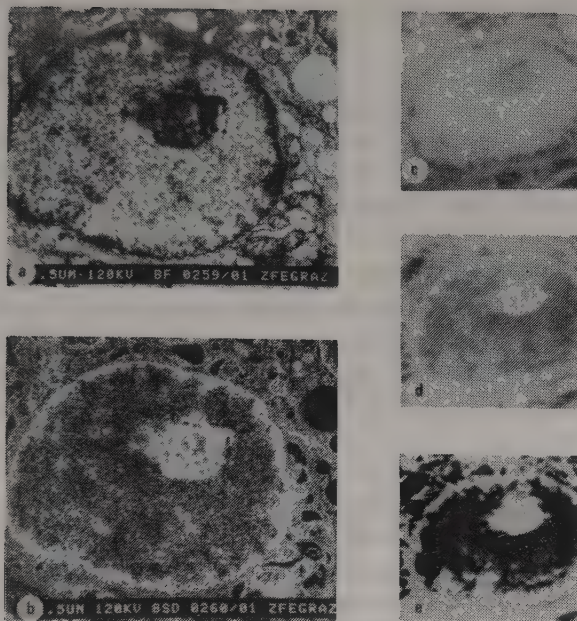


Fig.32 Die Bestimmung der Massendicke aus dem STEM-Backscatter-signal (b) der zugehörigen 120 kV Hellfelddaufnahme (a). im Maßstab (5000:1). Der gleiche Zellkern wird im TEM aufgenommen und mit der Farbanalyse verarbeitet. Die Hellfelddaufnahme (c) wurde bei 60 kV gewonnen, dazu entsprechen die Massendicken- und Elementarverteilungen (d) und (e). Es zeigt sich eine Übereinstimmung in der Massendickenverteilung (b und d).

IV.5.4.2 Untersuchung energiegefilterter Bilder

Durch ein Elektronenenergieverlustspektrometer können an biologischen Präparaten Elemente identifiziert werden. Dazu werden charakteristische Ionisationskanten, die durch inelastische Wechselwirkung der Elektronen mit den inneren Atomorbitalen entstehen, abgebildet.

Das EELS-Spektrum kann zur Berechnung der Dicke von biologischen Schichten herangezogen werden /Leapman et al., 1984/, indem man die Höhe des Zero-Loss-Peaks, d.h. die Gesamtintensität der Elektronen, die keinen Energieverlust erleiden, mit der Intensität der inelastisch gestreuten Elektronen (Plasmonpeak) vergleicht.

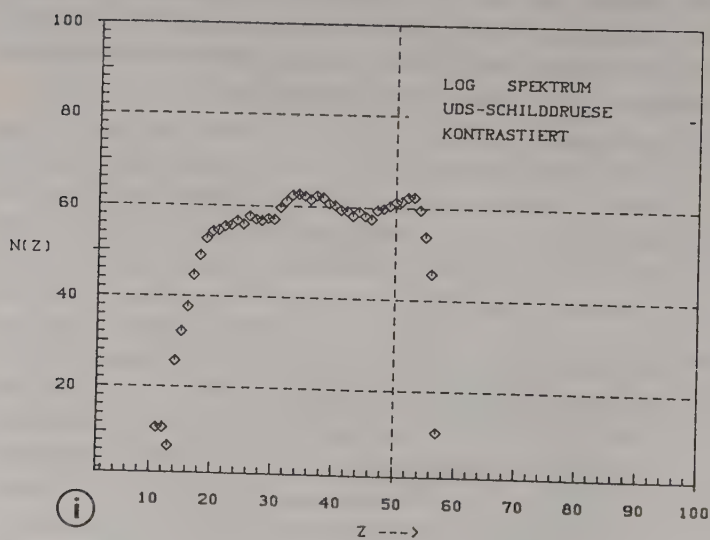
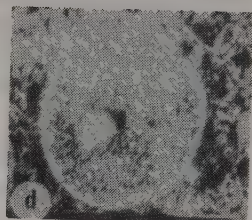
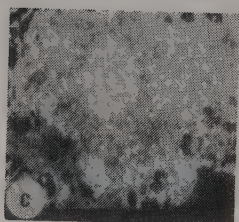
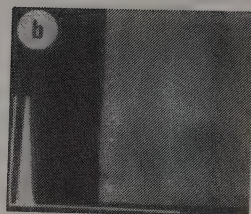
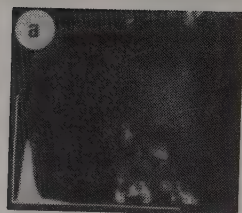
Die Bilder des Plasmonpeaks sind in den Abbildungen 33 e und f für den mit Osmium und Blei kontrastierten und den mit ausschließlich Osmium kontrastierten Ultradünnschnitt gegeben. Nach Verarbeitung zeigt sich für beide Schnitte ein konstanter und wertemäßig gleicher Verlauf, da beide Präparate die gleiche Schnittdicke besitzen.

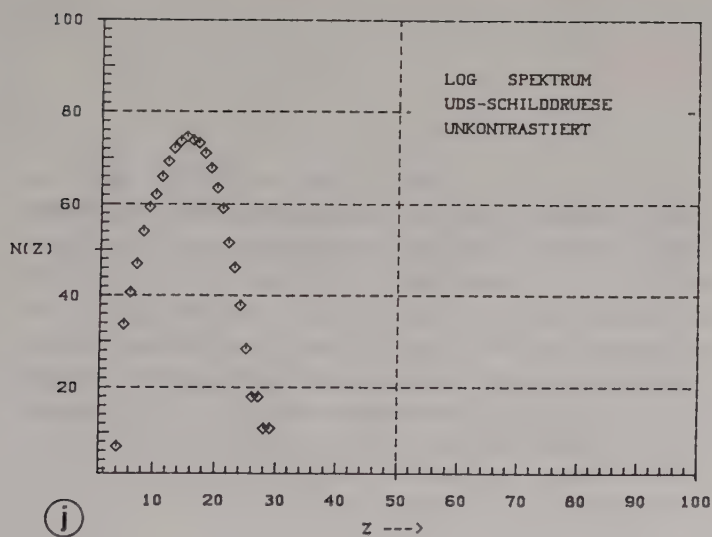
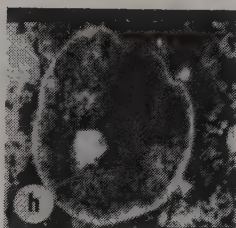
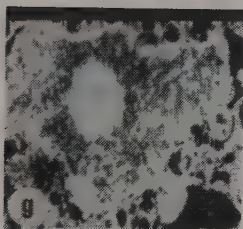
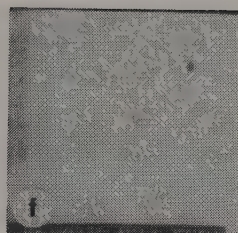
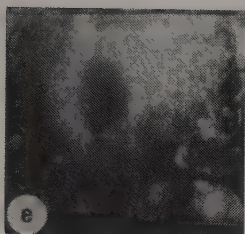
Eine andere Möglichkeit, das Energieverlustspektrum zur Auswertung heranzuziehen, besteht in der Bildung einer Z-Kontrastrelation des Plasmonpeaks mit dem Signal der elastisch gestreuten Elektronen, aufgenommen mit dem Dunkelfeld-Ringdetektor /Carlemalm und Kellenberger, 1982/. Diese Methode geht von der einfachen Gesetzmäßigkeit aus /Crewe, 1976/, daß die elastische Streuung proportional zu $t \cdot Z^{3/2}$, mit der Präparatdicke t , und die inelastische Streuung proportional zu $t \cdot Z^{1/2}$ ist. Die Division ergibt einen von t unabhängigen Z-Kontrast. Präparativ ist dafür Sorge zu tragen, daß sich der Ordnungszahlkontrast nicht durch einen Massendickenkontrast überlagert wird. Erschwerend kommt hinzu, daß nach neueren Arbeiten die inelastischen Streuquerschnitte im Bereich kleiner Ordnungszahlen keine einfache Z-Abhängigkeit zeigen, wodurch die Anwendung dieses Verfahrens für viele Präparate in Frage gestellt ist /Inokuti et al., 1981; Egerton, 1983/.

Die hier zu untersuchenden Präparate erfüllen zunächst nicht die notwendigen Bedingungen für ein "Elemental Mapping". Es zeigt sich an den Plasmonbildern in Abbildung e und f, daß in Regionen mit hoher Massendicke (und Elementen mit hoher Ordnungszahl), die inelastische Streuung geringer ist als in anderen Regionen. Damit werden die Voraussagen von Inokuti et al. /1981/ bestätigt, wonach die Anzahl der inelastisch gestreuten Elektronen mit steigendem Z abnimmt. Für Ordnungszahlen Z kleiner 40 werden die Relationen $Z^{1/2}$ und $Z^{-3/2}$ für die elastisch und inelastisch gestreuten Elektronen angegeben. Zum Erhalt eines Z-Kontrastes müßte damit das Signal der elastisch gestreuten Elektronen im Kontrast invertiert werden, bevor durch das inelastische Signal geteilt wird (andernfalls ergäbe sich ein Z^3 -Kontrast).

Die Durchführung der Division des invertierten elastischen Signales aus Abbildung c und d mit dem inelastischen Signalen aus e und f ergab die Verhältnisse in g und h. Die zugehörigen Spektren in i und j zeigen einen qualitativ ähnlichen Verlauf wie die Abbildungen 29 und 30. Daraus ist zu entnehmen, daß dieses Z-Kontrastverfahren auch an schwermetallfixierten biologischen Objekten nutzbar ist, bei denen die Massendicke im wesentlichen durch das Kontrastmittel bestimmt wird.

Fig.33 Ein mit Osmium und Blei kontrastierter (linke Reihe) und ein nur mit Osmium kontrastierter Dünnschnitt (rechte Reihe) werden im STEM analysiert. Den Kontrastumfang der Negative des Backscattersignale zeigt (a) und (b). Zum Erhalt eines Z-Kontrastes wird das Dunkelfeldsignal der elastisch gestreuten Elektronen (c und d) im Kontrast invertiert und durch das Signal der inelastisch gestreuten Elektronen des Plasmonpeaks (e und f) dividiert. Durch entsprechende Skalierung der Verhältnissignale in (g und h) ergeben sich Elementverteilungen (i und j), die mit den Ergebnissen der Farbanalyse in Fig.29e und 30 qualitativ korrelieren





IV.5.4.3 EDX-Messungen am STEM zur Feststellung relativer Konzentrationen

Die in einer Probe eintretenden Primärelektronen können unterschiedlich negative Beschleunigungen erfahren, wobei dieser Verlust an kinetischer Energie mit einem Wirkungsgrad von etwa 1% in Röntgenstrahlung umgesetzt wird und am STEM mit Hilfe eines energiedispersiven Analysators gemessen werden kann. In einer genügend dünnen Probe, die einen Transmissionsbetrieb ermöglicht, ist der Ionisierungsquerschnitt proportional zur Wahrscheinlichkeit einer Ionisation über den gesamten Bereich der Präparatdicke konstant. An solchen Präparaten kann die Röntgenabsorption vernachlässigt werden. Die Röntgenintensität zweier beobachteter Peaks I_a/I_b ist unabhängig von der Dicke. Das Gewichtsanteilverhältnis oder das Konzentrationsverhältnis c_a/c_b ist durch die Gleichung gegeben /Lorimer, 1984/:

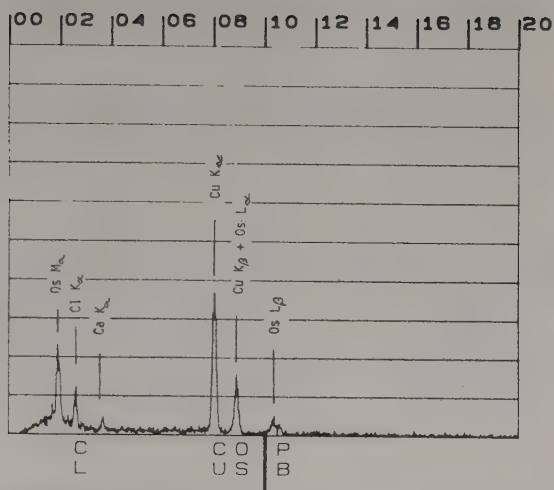
$$\frac{c_a}{c_b} = k \frac{I_a}{I_b} \quad (51)$$

Der Faktor k_{ab} gibt die relative Effizienz für die Erzeugung und Detektion von Röntgenstrahlung an. Die materialabhängige Seite dieses Faktors wurde experimentell von Cliff und Lorimer /1975/ und theoretisch von Wood et al. /1984/ untersucht. Es zeigt sich dabei ein Gang mit der Ordnungszahl und der benutzten Linie. Aus diesen Ergebnissen läßt sich feststellen, daß bei Elementen mit geringen Z-Unterschieden der Gang mit der Ordnungszahl vernachlässigbar ist. So dürfte der Unterschied zwischen Osmium und Blei je nach Linie zu einem Fehler von maximal 10% führen.

Dargestellt sind in Fig. 34 die Energiespektren eines mit Osmium (a) und eines mit Osmium und Blei kontrastierten Ultradünnschnittes (b). Je nach Vergrößerung und Bildausschnitt ergibt sich ein Intensitätsverhältnis in der M_{α} -Linie des Spektrums zwischen Osmium und Blei von 1/3. Die Berechnung der relativen Atomprozente nach der Cliff-Lorimer Methode (30 at% Os+70 at% Pb) ergibt ein Osmium/Blei-Verhältnis von ungefähr 1 : 2.5.

Dieses Ergebnis kann mit den entsprechenden Resultaten der polychromatischen Methode der Abbildungen 29 und 30 verglichen werden. Es kann abgeschätzt werden, daß bei der Kontrastierung mit Blei 1 Bleiatom auf 5 Atome des Kohlenstoff-Osmium-Gemisches eingelagert wird. Daraus ergibt sich ein Osmium/Blei-Verhältnis von 1:3. Dies zeigt eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Röntgenmikroanalyse.

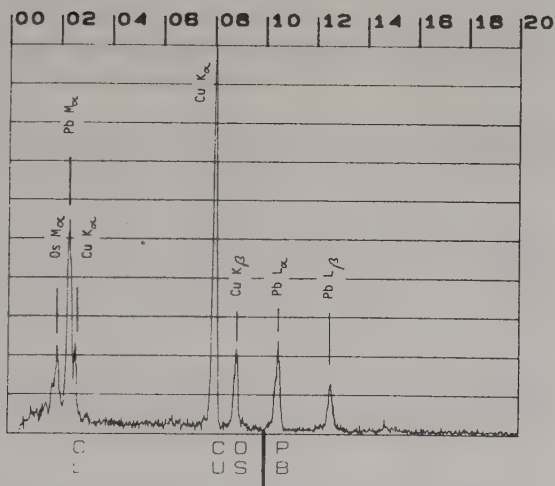
Fig. 34 Ergebnisse der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse eines mit Osmium (a) und eines mit Osmium und Blei (b) schwermetallkontrastierten Zellkerns



(a)

CURSOR (KEV) = 10.000

EDAX
CPS



(b)

CURSOR (KEV) = 10.000

EDAX
CPS

IV.5.5 Zusammenfassung des elementar-analytischen Teils

Es sollen die wichtigsten Ergebnisse des dritten experimentellen Teiles der Arbeit zusammengefaßt werden:

- es wurde eine Methode zur Herstellung und Bewertung polychromatischer elektronenmikroskopischer Bilder vorgestellt
- das Verfahren bewertet schwermetallfixierte biologische Präparate unter den Bedingungen des Streuabsorptionskontrastes
- es wird die Beschleunigungsspannung variiert
- aus empirischer Analyse theoretischer Modellrechnungen werden Algorithmen zur Abschätzung von Massendicke und relativer Elementzusammensetzung abgeleitet
- der experimentell ermittelte Farbwinkel stimmt mit dem theoretisch errechneten überein
- das STEM-Backscattersignal entspricht dem Massendickenverlauf der polychromatischen Methode
- aus der Analyse energiefilterter Bilder ergibt sich für Elemente mit steigender Ordnungszahl ein Abfall in der Anzahl der inelastisch gestreuten Elektronen
- die Ergebnisse einer modifizierten Z-Kontrast-Methode und EDX-Messungen sind mit den Ergebnissen der polychromatischen Methode vereinbar.

V. Diskussion

Angeregt durch die grundlegende Arbeit von Shannon /1948/ wurde der informationstheoretische Gedanke von verschiedenen Autoren in die Optik getragen /Elias, 1953; Wiener, 1953; Linfoot, 1956, 1959 und Röhler, 1967/. Abbildende Systeme, wie z.B. das Elektronenmikroskop, werden danach unter einem kommunikativen und nachrichtentechnischen Aspekt betrachtet. Die Informationstheorie bietet einen Ansatz, um den Gewinn an Information, den die elektronenoptische Abbildung eines Präparates erbringt, zu quantifizieren. Betrachtet man die Entropie der konstanten Elektronendichteverteilung im Endbild des Mikroskopes ohne Präparat ($H=0$) mit der durch ein Präparat modulierten Verteilung ($H>0$), so ergibt sich die gewonnene Information als Entropie des Signales.

Durch Eingriff in den Abbildungsvorgang des Elektronenmikroskops kann das Signal qualitativ und quantitativ verändert werden. Dies geschieht durch Wahl eines bestimmten Abbildungsmodus, einer anderen Fokuseinstellung oder durch Variation der Beschleunigungsspannung.

In der Informationstheorie wird davon ausgegangen, daß ein Sender eine statistische Folge von Zeichen (Informationen) erzeugt, d.h. man abstrahiert von einer Bedeutung und den damit verbundenen Auswahlprinzipien der Nachricht, auch in Hinsicht auf die Übertragung und Auswertung. Die in der Elektronenmikroskopie zur Untersuchung anstehenden Signale sind jedoch determiniert. So ist z.B. das elektronenmikroskopische Bild eines biologischen Dünnschnittes durch strukturelle und elementare Eigenschaften des Präparates festgelegt. Diese Tatsache ist von Bedeutung, wenn man die Kontrolle der Abbildung im Elektronenmikroskop, die Beurteilung und Optimierung des Bildaufnahmesystems und die Gestaltung der Bildauswertung als objektabhängig betrachtet.

In dieser Arbeit wird eine on-line Bildanalyse am Transmissions-elektronenmikroskop unter überwiegend informationstheoretischen Gesichtspunkten beschrieben. Zur direkten Bilderfassung werden drei verschiedene Konfigurationen untersucht, die aus den Komponenten Szintillator, Optik, und TV-Kamera bestehen (Kap. IV.1). Solche Systeme können als Übertragungskette dargestellt werden. Ähnliche Ketten sind auch in der Röntgentechnik diskutiert worden /Frieser, 1975; Stieve, 1966/.

Bei der Übertragung des Signales durch einen Kanal wird eine objektgetreue Abbildung verlangt. Additives Rauschen oder eine Bandbegrenzung kann jedoch die Information verändern.

Um eine Systemanalyse bezüglich des Übertragungsverhaltens durchzuführen, wird das Konzept der Modulationsübertragungsfunktion (MTF) benutzt (Kap. IV.2.2). Dabei wird dem System ein Testobjekt angeboten, welches eine objektunabhängigkeit gewährleistet. Dies kann z.B. eine Kante sein, die nach Differenzierung und Fouriertransformation alle Ortsfrequenzanteile als weißes Spektrum besitzt. Eine andere Möglichkeit besteht in der Abbildung eines statistischen Signals, wie z.B. das Elektronenrauschen, und der Bestimmung der MTF aus dem Wiener-Spektrum. Dieses Vorgehen orientiert sich nach einer in der Röntgentechnik vorgeschlagen Methode /Rossmann, 1967 a,b /. Die Durchführung beider Methoden ergibt vergleichbare Resultate. Die TV-Kamera leistet dabei den wesentlichen Beitrag zur Bandbegrenzung.

Die Empfindlichkeit der Erfassungssysteme läßt sich durch eine Intensitätsübertragungsfunktion (ITF) beschreiben, die einen Zusammenhang zwischen der Elektronendichteverteilung im Endbild des Elektronenmikroskops und dem Grauwert des digitalisierten Bildes herstellt. Die ITF hängt von den Eigenschaften des Szintillators bezüglich der Quantenausbeute, der Apertur der Zwischenoptik, der Empfindlichkeit der TV-Röhre und der elektronischen Verstärkung ab (Kap. IV.2.3).

Eine weitere Eigenschaft von Bildaufnahmesystemen ist der äquivalente Quantennutzeffekt (DQE), der sich aus dem Quotient der Signal-Rausch-Verhältnisse von Eingang und Ausgang berechnen läßt (Kap. IV.2.5). Dabei ist die erste Wandlungsstufe, d.h. der Szintillator, wesentlich, da eine geringer Signal-Rausch-Abstand durch weitere Stufen nicht verbessert werden kann. Diese Tatsache wird durch das Varianztheorem nach Mandel /1959/ ausgedrückt. Das Signal ist in den einzelnen, weiteren Stufen so zu verstärken, das die Signalschwankungen stets größer als die Schwankungen additiver Rauschquellen bleiben.

Verschiedene Bilderfassungssysteme lassen sich zur Abschätzung ihrer praktischen Verwendbarkeit durch eine Vergrößerungs-/Auflösungscharakteristik beschreiben. Eine solche Charakteristik wurde erstmals von Hobbs /1984/ für die visuelle Wahrnehmung angegeben und wird hier auf die visuelle Wahrnehmung mit technischen Hilfsmitteln übertragen. Dabei wird mit einer erweiterten Rose-Gleichung die Auflösung bei Variation der Vergrößerung bei konstanter primärer Elektronenstrahldichte gerechnet. Die charakteristischen Kurven werden dabei durch zwei Einhüllende gekennzeichnet. Zu kleineren Vergrößerungen hin begrenzt die MTF, zu hohen Vergrößerungen begrenzt die DQE die Auflösung (Kap. IV.2.6). Hieraus ergibt sich, daß der getestete seitliche Anschluß für Untersuchungen im Bereich mittlerer Vergrößerungen, der Faserplattenanschluß mit einer LLL-TV-Kamera dagegen für detaillierte Studien bei hohen Vergrößerungen geeignet ist. Die fotografische Platte erreicht durch das sehr gute Auflösungsvermögen schon im mittleren Vergrößerungsbereich das Auflösungsvermögen des Mikroskops.

An den charakteristischen Kurven ist zu bedenken, daß digitale Detektionsmechanismen in der Lage sind, bessere Ergebnisse zu erbringen. Dazu werden unter dem Begriff des Detektionsnutzeffektes (DE) verschiedene Kriterien verglichen (Kap. IV.2.6). Die visuelle Detektion nach Rose, die in der Bildverarbeitung mit einer Tiefpaßfilterung vergleichbar ist, weist eine DE von 4% auf, während ein Template Matching Filter /Frank, 1980/ oder ein Varianzverfahren /van Heel, 1981/ einen Nutzeffekt zwischen 20% und 100% erreichen.

Vergleicht man die aus den MTFs berechnete Informationsdichte (unter Voraussetzung einer statistischen Signalmenge) mit der Informationskapazität digitaler Speicher, so ergibt sich eine Speicherauslastung von weniger als einem Promille (Kap.IV.2.7). Ob andere Bildaufnahmesysteme (z.B. CCDs) in der Lage sein werden, die Informationsdichte im Endbild zu erhöhen, muß abgewartet werden. Die fotografische Schicht dagegen nutzt die Information des elektronenmikroskopischen Bildes so aus, daß dies mit der Kapazität digitaler Speicher vergleichbar ist. Jedoch müssen bei dem Vergleich die Schwächen der fotografischen Informationsaufzeichnung wie Nichtlinearitäten, "off-line" Charakter und Aspekte der Strahlenschädigung Berücksichtigung finden.

Die Bildvorverarbeitung der digital gespeicherten Bilder verfolgt das Ziel, Rauschen aus den Bildern herauszufiltern, Störungen zu beseitigen und den Abgleich des Mikroskops zu unterstützen (Kap. IV.3). Moderne Bildspeicher bieten insbesondere die Möglichkeit einer Bildakkumulation (Kap. IV.3.2), die sich unter theoretischen Gesichtspunkten als optimal erweist, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern / Erasmus, 1982 / . Als eine schnelle Methode zu Filterung des Rauschens im Ortsbereich erweist sich die Noise-Cheating Methode , welches für die Auswertung fotografischer Schichten entwickelt wurde /Zweig et al., 1975/. Das Verfahren berücksichtigt den im Bild vorhandenen tatsächlichen Dynamikumfang, setzt gegenüber anderen Methoden (z.B. Median-Filter) die Auflösung jedoch nicht wesentlich herab (Kap. IV.3.3).

Der Einsatz von Fokuskriterien bewirkt unter dem informations-theoretischen Aspekt eine Maximierung die Kanalkapazität der Übertragungsstrecke /Felten, 1981/. Da in der Praxis, wie Eingangs erwähnt, die zu untersuchenden Objekte determiniert sind, versagt in der Regel auch das Entropiekriterium als Fokuskriterium. Abhilfe und eindeutige Ergebnisse bringt jedoch die Betrachtung der Entropie von Koppelfeldern (Markov-Modell), wobei Übergangswahrscheinlichkeiten bewertet werden /Reinhardt und Sträßle, 1981/. Die Werte nehmen insbesondere bei kleinen Bildfeldern im Optimalfokus ein deutliches Maximum ein, dessen Lage mit dem anderer Kriterien übereinstimmt (Kap. IV.3.5).

In der Bildauswertung stellt sich für die Auswahl eines bestimmten Verfahrens die Frage nach Erkennung relevanter Information. Für verschiedene Aufgabenstellungen werden vage und subjektive Begriffe wie "Bildinhalte", "Details" oder "Daten" hervorgehoben und ausgewertet. Für viele Bildverarbeitungsaufgaben fehlen Strategien und Qualitätskriterien, um bestimmte Verfahren zu bevorzugen und systematisch und zielgerichtet vorzugehen.

Unter einem informationstheoretischen Aspekt stellen sich zwei verschiedene Möglichkeiten ein, relevante Information zu beurteilen, und zwar als die Information, die

- 1) für eine objektgetreue Rekonstruktion wesentlich ist
oder
- 2) für das anstehende Analyseproblem wesentlich ist.

Verfahren unter Punkt 1) versuchen, die durch Bandbegrenzung und additives Rauschen veränderten Signale zu rekonstruieren. Das Problem liegt darin, innerhalb eines iterativen Verfahrens die Qualität des restaurierten Bildes zu beurteilen. Dies geschieht unter dem Gesichtspunkt einer Wahrscheinlichkeitsüberlegung. Es wird das wahrscheinlichste, d.h. mit maximaler Entropie, auftretende Bild ausgewählt. Diese Rekonstruktionsverfahren sind unter den Begriffen Maximum Likelihood und Maximum Entropie bekannt /Frieden, 1972; Childers, 1978/.

Bildanalytische Verfahren unter Punkt 2) verfolgen ein anderes Ziel. Es wird ein solches Verfahren gesucht, das den strukturellen Aufbau und den Ordnungszustand des Bildes erkennt. Die Suche nach einer Ordnung oder Struktur im Bild deutet auf niedrige Entropiewerte hin. Die meisten bildanalytischen Verfahren zur Mustererkennung sind ihrer Natur nach Minimum Entropie Verfahren /Watanabe, 1981/. Die Schwierigkeit liegt in einer angemessenen Definition des Analyseproblems, sodaß es im Sinne der Entropie-minimierung mathematisch traktabel ist.

Eine Möglichkeit zur Beschreibung struktureller Eigenschaften bildlicher Information bietet die Texturanalyse (Kap. IV.4). Es gibt keine einheitliche Definition für den Begriff der Textur. In der Praxis stellt sich die Frage nach einem Verfahren, welches für die gegebene Problemstellung die Textur am besten beschreibt. Für die Beurteilung biologisch-zytologischer Objekte hat sich ein Konturlinienverfahren mit statistischer Analyse bewährt /Harms, 1982/. Gradientenverfahren mit einem Konturfolgealgorithmus versagen jedoch bei den verrauschten, niederkontrastigen elektronenmikroskopischen Bildern. Es wird daher ein Verfahren vorgestellt, welches sich an einem Modell der physiologischen Optik orientiert, und im Sinne der unscharfen Maske im Ortsfrequenzbereich einen Bandpaß darstellt /Marr, 1982; Watt und Morgan, 1983; Kriete, 1981; Block, 1983/.

Ein entsprechender digitaler Filter wird im Ortsbereich durch Subtraktion zweier unterschiedlich großer Boxcarfilter realisiert. Dieser Filter gibt nur bei Änderungen im Grauwertverlauf ein "Signal". Er zeigt eine enge Verwandtschaft zum informationstheoretischen Maß der Entropie von Koppelfeldern, da auch hier Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen Bildelementen bewertet werden. Das informationstheoretische Maß kann genutzt werden, um vor der Texturanalyse abzuschätzen, in welchem Ortsfrequenzbereich die zu untersuchenden Objekte besonders differieren (Kap. IV.4.3).

Zur Durchführung einer statistischen Analyse wird nach der Bandpaßfilterung eine Detektion charakteristischer Punkte (Nulldurchgänge, Sattelpunkte, Extrema) durchgeführt und die Dichte und Varianz der Punkte bewertet. Die medizinische Anwendung auf tumorveränderte Schilddrüsenzellkerne zeigt die Möglichkeit einer automatisierten Differenzierung auf, wobei die Ergebnisse mit ähnlichen Erhebungen am Lichtmikroskop korrelieren /Kriete et al. 1983 und 1985/.

Das Verfahren ist in Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit interaktiv-manuellen Verfahren überlegen. Durch die Reduktion der Bildinformation auf signifikante Informationen, die z.B. als Nullstellen Änderungen im Grauwertverlauf anzeigen, ist die entwickelte Texturanalyse eine Minimum Entropie Methode.

Zur Abschätzung elementarer Eigenschaften biologischer Dünnschnitte am Elektronenmikroskop wird ein farbanalytischer Ansatz gewählt (Kap. IV.5). Das Verfahren orientiert sich dabei an einem polychromatisches Verfahren in der Röntgentechnik zur stofflich selektiven Wiedergabe /Backmund und Boseck, 1969/. Am Elektronenmikroskop wird die Beschleunigungsspannung variiert (20, 60, 100 kV), d.h. mit verschiedenen de Broglie-Wellenlängen gearbeitet, wobei eine kurze Wellenlänge die Wahrscheinlichkeit für einen Streuabsorptionsprozeß verringert. Unter den Bedingungen des Streuabsorptionskontrastes ändert sich der strukturelle Aufbau des Bildes, durch die Bildphase festgelegt, nicht. Es ändern sich jedoch die relativen Kontrastverhältnisse, die, ebenso wie strukturelle Änderung bei der Texturanalyse, durch die Entropie von Koppelfeldern beschrieben werden (Kap. IV.5.2).

Die bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen aufgenommenen Bilder können nach dem Alignement auf einem Farbmonitor überlagert werden. Aus Modellrechnungen werden empirisch Formalismen abgeleitet, die eine Bestimmung der absoluten Massendicke und relativen Elementzusammensetzung an schwermetallfixierten biologischen Objekten ermöglichen. Zwischen beiden Faktoren besteht an den untersuchten Dünnschnitten ein direkter Zusammenhang (Kap. IV.5.3). Diese Art der Auswertung wird in der Histochemie als ein nützliches Hilfsmittel zur Quantisierung von Nachweismethoden angesehen /Glick, 1977, 1980/.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, werden vergleichende Messungen an einem TEM mit Rasterzusatz durchgeführt (Kap. IV.5.4). Es werden die analytischen Möglichkeiten des Backscatterdetektors, des Energiefilters und des Röntgenmikroanalysators genutzt. Der Backscatterdetektor zeigt den engen Zusammenhang zwischen Massendicke und Elementzusammensetzung an den untersuchten Präparaten. Mit Hilfe des Energieanalysators kann durch Herausfiltern der inelastisch gestreuten Elektronen und Bildung des Quotienten mit den elastisch gestreuten Elektronen des Dunkelfeldes ein sogenannter Z-Kontrast erzeugt werden. Die Ergebnisse weisen auf die prinzipielle Möglichkeit hin, auch bei dickeren, kontrastierten Präparaten die Elementverteilung zu beurteilen, wobei die inelastische Streuung bei Elementen mit höherer Ordnungszahl relativ geringer ist als die Lenzsche Regel voraussagt /Lenz, 1965/.

Auf diese Tatsache ist in jüngster Zeit auch von anderen Autoren hingewiesen worden /Inokuti et al., 1981, Egerton, 1983/. Die an den Präparaten gemachten Untersuchungen weisen, ebenso wie Konzentrationsmessungen mit der Röntgenmikroanalyse, auf eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der polychromatischen Methode hin.

Die vorgestellte Farbanalyse nutzt insbesondere Änderungen im Verhältnis der elastisch gestreuten Elektronen zu den inelastisch gestreuten Elektronen aus. Dieses Verhältnis ändert sich mit der Beschleunigungsspannung. Durch Variation der Kontrastblende fallen die erzielbaren Kontrastunterschiede in der Praxis geringer aus, da die Apertur zur zweiten Potenz, die Beschleunigungsspannung über die Definition der de Broglie Wellenlänge jedoch zur vierten Potenz in den Wirkungsquerschnitt eingeht.

Da das vorgestellte Verfahren Kontrastunterschiede, d.h. nichtredundante Information zwischen Bildern darstellt und ausnutzt, kann auch diese Methode im weiteren Sinn als eine Minimum Entropie Methode aufgefaßt werden.

Dem Kriterium Entropie von Koppelfeldern kommt in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Bedeutung zu (Kap. IV.3.5, 4.3, 5.2):

- es beschreibt Grauwertübergänge zwischen verschiedenen großen Bildflächen (Ortsfrequenzbereichen) bezüglich einer Nah- oder fernordnung und ist daher mit dem Strukturspektrum verwandt
- hohe Entropiewerte weisen auf relevante Bildinformationen hin, so daß hieraus für eine Bildanalyse ein Hinweis auf bestimmte Bereiche des Ortsfrequenzspektrums gegeben wird
- das Maß berücksichtigt neben den strukturellen und elementaren Objektparametern die Systemeigenschaften (vergleichbar mit dem Begriff der Faltung).

Das informationstheoretisch orientierte Maß trägt somit zur Systematisierung der Bildanalyse bei.

VI. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird eine on-line Bildanalyse am Elektronenmikroskop unter einem informationstheoretischen Aspekt durchgeführt. Der sich aus diesem Ansatz ergebende Modellcharakter der Arbeit weist mehrere Vorteile auf:

- ein abbildendes System mit verschiedenen optischen und elektronischen Abbildungs-, Wandlungs-, und Verstärkungsstufen läßt sich als informationstheoretische Übertragungskette beschreiben. Dadurch ergibt sich eine Vereinheitlichung in der Analyse der Güte (z.B. MTF) und der Leistungsfähigkeit (z.B. Kapazität) einzelner Stufen
- die Bildvorverarbeitung verbessert unter einer informationstheoretischen Betrachtungsweise die Übertragungseigenschaften und damit die Bildqualität des Systems meßbar
- die Bildauswertung unter einem informationstheoretischen Aspekt verfolgt das Ziel, Signale, die in bekannter (da analysierter) Weise durch das abbildende System verändert worden sind, auf ihren relevanten Informationsgehalt hin auszuwerten.

Zur Beschreibung der Systemeigenschaften wird von einer Auswahl oder Bedeutung der Signale abstrahiert, um eine Objektunabhängigkeit zu gewährleisten. Dies hat entscheidend mit zum Erfolg der Informationstheorie beigetragen. Um den informationstheoretischen Gedanken in die Bildverarbeitung zu tragen, muß der deterministische Charakter der zu untersuchenden Objekte berücksichtigt werden.

Der informationstheoretische Ansatz läßt in der Bildanalyse einen hohen Grad an Systematik erkennen, den ad-hoc Methoden oder semantische und syntaktische Strategien, nicht erbringen.

A. Anhang

A.1 Abschätzung der Temperaturerhöhung im Präparat bei Elektronenbestrahlung

Zur Berechnung der Temperaturerhöhung T' im Präparat ist die Kenntnis der Energieverlustrate nötig, die sich aus dem inelastischen Streuquerschnitt ergibt. Der elastische Querschnitt kann vernachlässigt werden, da er im Verhältnis zum inelastischen Querschnitt gering ist. Die Energieverlustrate in Abhängigkeit von der Massendicke mx berechnet sich in ihrer nichtrelativistischen Form aus der Bethe-Formel für einen Festkörper mit N Atomen pro Einheitsvolumen, der Ordnungszahl Z /Reimer, 1984/:

$$\frac{dE}{dmx} = - \frac{e^4 NZ}{4\pi\epsilon_0^2 m^2 v^2} \ln \left(\frac{m v^2}{J} \right) \quad \text{mit } J \approx 13.5 \cdot Z \quad (A.1)$$

Dabei repräsentiert J die Ionisierungsenergie eines Atoms in eV, ϵ_0 die elektrische Leitfähigkeit des Materials. Eine hohe Beschleunigungsspannung (Energie der Elektronen) kann demnach bei gleicher Elektronendichte die Energieverlustrate mindern.

Die Lösung der radialen Form der Differentialgleichung für die Temperaturleitung ergibt für die maximale Temperaturerhöhung im Zentrum einer bestrahlten Fläche /Hobbs, 1984/:

$$T'_{\max} = i_{\text{tot}} \cdot \frac{(dE/dmx)/e}{2\pi k} (0.5 + \ln s/b) \quad (A.2)$$

$$\text{mit } i_{\text{tot}} = \pi j b^2$$

und b als Radius der bestrahlten Fläche, k der thermischen Leitfähigkeit des Materials und s dem Abstand zu einer Temperatursenke, zum Beispiel den Maschen des tragenden Kupfernetzes.

A.2 Diskussion der Rose-Gleichung und Vergleich mit digitalen Kriterien

Der Erkennungsprozeß an durch Quantenrauschen begrenzten Systemen ist ein fundamentales Problem der Informationstheorie. Die Rose-Gleichung 24 ist in ihrer ursprünglichen Form für die visuelle Wahrnehmung entwickelt und später auch für die Voraussage der Detailerkennung an abbildenden TV-, radiologischen und elektronenmikroskopischen Systemen angewandt worden. Mit dem Aufkommen digitaler Bildverarbeitung wurden im Sinne künstlicher Intelligenz neue Methoden zur Detektion entwickelt. Die Anwendung dieser Algorithmen zeigt, daß die Detektierbarkeit nicht nur von der Art des Objektes und von den Abbildungsbedingungen abhängt, sondern auch von der Art des Erkennungsprozesses selbst. Der ideale Detektor ist nur durch das im Bild vorhandene Rauschen begrenzt. Abweichungen vom idealen Detektor sollen im folgenden als Detektionsnutzeffekt ($DE = \text{Detection Efficiency}$) bezeichnet werden. Die DE ist definiert als das Quadrat aus dem Verhältnis von experimenteller zu idealer Detektion /Barlow, 1978/.

Die Detektion selbst ist im einfachsten Fall ein binärer Entscheidungsprozess. Ob ein Testobjekt gesehen wird oder nicht, wird in der physiologischen Optik als Schwellenbeobachtung innerhalb eines vorgegebenen Zeitintervalls durchgeführt. Das Ergebnis unterliegt dabei nicht nur den individuellen Schwankungen der Testpersonen, sondern zeigt auch einen Gang mit der Leuchtdichte, Feldgröße und Signalform. Dies ist eine Konsequenz aus dem prinzipiell nichtlinearen Verhalten des Gesichtssinnes.

Es werden im folgenden drei verschiedene Fälle diskutiert, in denen das visuelle System in einer typischen Weise arbeitet und detektiert: 1) Detektion rauschfreier Objekte bei etwa mittleren Leuchtdichten (10^{-3} - 10^3 footlambert), 2) Detektion von verrauschten Objekten bei mittleren Leuchtdichten und 3) Detektion bei geringen Leuchtdichten bis zur Wahrnehmungsgrenze (10^{-3} footlambert).

- Detektion rauschfreier Objekte bei hohen Leuchtdichten

Diese Situation herrscht bei der Beobachtung des elektronenmikroskopischen Leuchtschirmes bei niedrigen Vergrößerungen oder bei der Beobachtung des Bildes des TV-Monitors einer unempfindlichen Kamera vor. Experimente der physiologischen Optik an Testpersonen zeigen, daß bei einer bestimmten mittleren Objektgröße, z.B. der Breite eines Balkens oder eines Sinusgitters bestimmter Frequenz, der Detektionsnutzeffekt am größten ist, d.h. die DE korreliert mit der Kontrastsensitivität. Der Bandpaßcharakter des visuellen Systemes ergibt sich aus der Tiefpaßfilterung der Optik des Auges einerseits und der hochpaßfilternden Wirkung der neuronalen Verschaltung der Netzhautelemente andererseits zusammensetzt. Diese Effekte lassen sich unter bestimmten Grundannahmen im Rahmen einer linearen Systemtheorie beschreiben.

- Detektion verrauschter Objekte bei mittleren Leuchtdichten

Dies tritt immer dann ein, wenn empfindliche Detektoren wie LLL-TV-Kameras oder Restlichtverstärker das Quantenrauschen deutlich auf einem TV-Monitor wiedergeben oder schwache Signale von Rauschen überlagert werden, wirkliche und rauschäquivalente Leuchtdichte sind hierbei verschieden. Das Modell, das in diesem Fall dem Detektionsprozeß zugrunde gelegt wird, entspricht dem "Matched Filtering". Dabei wird die Strategie verfolgt, eine Korrelation zwischen einem Signal der Fläche s^2 und einer gleichgroßen Vergleichsfläche durch Aufsummation der Intensitäten herzustellen. Die Detektion d' des idealen Detektors ergibt sich aus statistischen Erwägungen mit der Standardabweichung δ des Rauschens zu /Sullivan, 1983/:

$$d' = \frac{K \cdot s}{\delta} \quad (\text{A.3})$$

An durch Quantenrauschen begrenzte Systeme ist δ gleich $\sqrt{\bar{N}}$, mit $\bar{N}$ als die mittlere Anzahl der Quanten.

Experimente mit Testpersonen zeigen als Ergebnis, daß das visuelle System bei Rauschen ein mit dem Modell des "Matched Filtering" vergleichbares lineares Verhalten zeigt. Die Detektion ist damit, im Gegensatz zum ersten Fall, von der Form oder Größe des Objektes unabhängig. Der Detektionsnutzeffekt ist jedoch mit 5-10% gering (Fig.I.13)

- Detektion bei niedrigen Leuchtdichten

In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, daß das Bild auf der Netzhaut durch das Quantenrauschen bestimmt wird. Diese Situation tritt am Elektronenmikroskop bei direkter Betrachtung des Leuchtschirmes und hohen Vergrößerungen auf. Aus Schwellenbeobachtungen an Kreisscheiben ermittelte Rose /1948, 1957/ in der Beziehung

$$I = \frac{k^2}{k^2 \beta^2} \quad (A.4)$$

mit dem Sehwinkel β die Konstante k zu 4 - 5. Diese Konstante legt das Signal-Rausch-Verhältnis fest, welches im Sinne der Varianz des Rauschens definiert ist. Die Konstante sagt aus, daß ein Signal, welches sich nur um die Varianz des Rauschens vom Hintergrund abhebt ($k=1$), noch nicht detektiert werden kann.

Es soll nun ein Vergleich mit den technischen Modellen angestrebt werden, die im Sinne künstlicher Intelligenz als digitale Bildanalysealgorithmen für Detektionsaufgaben genutzt werden. Als Modell für die Rose-Gleichung bietet sich die digitale Tiefpaßfilterung an. Wird das Signal-Rausch-Verhältnis wiederum als die relative Höhe des Signales zur dreifachen Höhe der Standardabweichung gesetzt, so ergibt sich nach van Heel /1981/:

$$I = 18 \frac{1 + \frac{K}{2}}{s^2 \cdot K^2} \quad (A.5)$$

Diese Gleichung hat bei niedrigen Kontrasten $K \rightarrow 0$ in die Form der Rose-Gleichung. Diese Übereinstimmung könnte zeigen, daß das visuelle System unter bestimmten Bedingungen wie ein Tiefpaßfilter arbeitet.

Erstmals für das Gebiet der kohärenten Optik von van der Lugt /1956/ als "Template Matching" durchgeführt, wird Matched Filtering üblicherweise als die Korrelation eines Bildes mit einem Referenzbild verstanden. Auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie liegen Ergebnisse über die Korrelation eines verrauschten Signales mit einem verrauschten Referenzbild vor. Dabei ergibt sich nach Frank und Saxton /1977/ die Beziehung:

$$I = \frac{3}{K^2 \cdot sd} \quad (A.6)$$

Hierbei ist das Signal-Rausch-Verhältnis als das dreifache der Standardabweichung des Rauschens in der Korrelationsfunktion definiert. Andere Methoden des Matched Filtering beruhen auf bildabtastende Algorithmen mit der Berechnung der Varianz zwischen Objekt und Hintergrund / M. van Heel, 1981 / oder auf der Differenz zweier Tiefpaßfilter (DOG = Difference-of-Gaussian - Filter) /Marr, 1982/. Zur Zeit ist nicht geklärt, ob diese Modelle auch das "Perceptual Filtering" beschreiben.

Die Empfindlichkeit der einzelnen Kriterien kann unter dem Begriff des Detektionsnutzeffektes an der Auflösungsgrenze verglichen werden. Für den idealen Detektor gilt nach Gleichung A.3:

$$\delta = \frac{K \cdot s}{d'} \quad (A.7)$$

Bei rauschäquivalenten Leuchtdichten ergibt sich mit der Anwendung der Poissonstatistik die Standardabweichung zu $\sqrt{N}$. An der Auflösungsgrenze ist der Objektdurchmesser s gleich dem Aperturdurchmesser d . Für das Template Matching Kriterium nach Formel A.6 und Auflösung nach der Standardabweichung ergibt:

$$\delta = \frac{3}{K \cdot s} \quad (A.8)$$

Gleichsetzen mit dem idealen Detektor und Auflösen ergibt d' zu $1/\sqrt{3}$, mit der Definition des Detektionsnutzeffektes

$$DE = \left(\frac{d'_{\text{exp}}}{d'_{\text{ideal}}} \right)^2 \quad (A.9)$$

an der Auflösungsgrenze einen Nutzeffekt von 33% für das Template Matching Kriterium. Die entsprechende Durchrechnung für das Varianzkriterium und das Rose-Kriterium ergibt 22 und 4%.

Summary

Kriete, Andres:

On-line image analysis on a transmission electron microscope for the estimation of structural and elemental properties of biological thin sections

Digital on-line image analysis on a transmission electron microscope (TEM) is performed under the condition of scattering absorption contrast. The study includes a system analysis of the TV-scanning devices, a discussion of different preprocessing methods and the analysis of structural and elemental properties of biological, stained thin sections, with special emphasis on information theoretics.

Three TEM/TV-adaptors for direct, on-line access to the TEM image including the components scintillator, optic and sensitive TV-camera are tested: 1) a tandem-optic with a Chalnicon camera, 2) a swing-in optic with a Saticon camera and 3) a fiber plate with a LLL TV camera.

The modulation transfer functions (MTFs) of the configurations are determined by Fourier transformation of the system response at an edge, in the case of the LLL TV camera also by the Wiener spectrum of the imaged single electron noise. Intensity transfer functions (ITFs) document the relation between the electron density and the gray value of the digitized image. The detective quantum efficiency (DOE) is measured by the signal-to-noise ratio (SNR) between signal input and output. Additionally, the information density and capacity is calculated.

To compare the systems under practical aspects, the results of the measurements are summarized in the form of a magnification-/resolution characteristic. Photographic films show a much better use of the electron image information, but their "off-line" character, nonlinearities and aspects of radiation damage are drawbacks for many applications.

Several methods for the preprocessing of low contrast and noisy TV-scanned images are tested. A nonlinear noise filtering method, called noise cheating, can be successfully applied. To maximise the transfer capacity of the system, several methods are tested which evaluate image sharpness.

Image analysing methods are described to detect non redundant information within and between images. In the structural-analytical portion of this investigation a texture algorithm is developed. Based on a model of visual perception, the image is bandpass filtered, and characteristic points in the second derivative image, such as zero-crossings, inflexions and extrema are detected and statistically analysed. A relationship of this method to the entropy of Markov processes can be demonstrated. The application of such a method to the chromatin structure in tumor cell nuclei demonstrates the possibility of an automated differentiation.

For the analysis of elemental properties of stained biological sections a polychromatic method is developed. This method utilizes the change in the TEM absorption contrast when the acceleration voltage varies. Images scanned at acceleration potentials of 20, 60 and 100 kV are aligned and analysed for their differences. With the help of theoretical calculations information about mass thickness and relative elemental composition can be derived. Both factors are strongly related in stained sections. The results are compared with scanning transmission electron microscope (STEM) measurements.

Literaturverzeichnis

- Agar,A.W.; Alderson, R.H. (1974) Principles and practice of electron microscopic operation. in:(Ed.) Glauert,A.M.: Practical methods in electron microscopy. North-Holland / Am.Elsevier Publ.Corp., Amsterdam
- Alsberg,H.; Hartmann,R.E. (1976) High Resolution Electron Microscope Imaging with Silicon Diode Array Vidicons, in: (Eds.) Morgan,B.L.; Airey,R.W.; McMullan,D.: Photo-Electron Image Devices, Academic Press, London: 287
- Anderson,K. (1968) An image intensifier for the electron microscope. Journal of Scientific Instruments,1,2: 601
- Andrews, H.C. (1968) Entropy considerations in the frequency domain. Proc. IEEE, 56,1: 113
- Backmund,H.; Boseck,S. (1969) Gedanken zu einer polychromatischen Radiologie als Methode einer stofflich selektiven Detailwiedergabe im Röntgenfernsehen. Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmediziner, Thieme-Verlag, Stuttgart, 110,3: 400
- Bahner,E. (1976) Untersuchung zur Bildverfälschung bei photographischen Prozessen. Optik 45,2: 123
- Bahr,G.F.;Zeitler,E. (1965) The dection of dry mass in populations of isolated particles. Lab.Invest. 14: 955
- Barlow, H.B. (1978) The absolute efficiency of human pattern detection in: (Eds.) Cool and Smith: Frontiers in visual science, Springer - Verlag, New York. 1978
- Billingsley,F.C. (1979) Noise considerations in digital Image Processing. in: (Huang, T.S) Picture processing and digital filtering, Springer, N.Y. : 249

Block,H. (1983) Theoretische Untersuchungen zur Ortsfrequenz-abhängigkeit des neuronalen lateralen Systems des menschlichen Auges und die Anwendung in der Bildverarbeitung. Diplomarbeit, Uni.Bremen

Born,M.; Wolf,E. (1980) Principles of optics, 6th edition, Pergamon Press, New York

Boseck,S. (1971) Ermittlung des optimalen Bildes aus einer fotografischen Fokusserie in der Licht- und Elektronenmikroskopie mit Hilfe der Fraunhoferschen Beugung (Strukturspektroskopie). Phot. Korrespondenz 107,2 : 19

Boseck,S. (1980) Die Elektronenmikrografie und ihre Beurteilung. Lehrband Techn. Akad. Esslingen: Bildqualitätsanalyse in der Elektronenmikroskopie

Boseck,S.; Lange,R. (1970) Ausschöpfung des Informationsgehaltes von elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe des Abbeschen Beugungsapparates, gezeigt am Beispiel kristallartiger Strukturen. Z. wiss. Mikrosk. 70: 65

Brady,M.(1982) Computational approaches to image understanding. Computing Surveys, 14, 1: 3-71

Carlemalm,E.; Kellenberger,E. (1982) The reproducible observation of unstained embedded cellular material in thin sections: visualisation of an integral membrane protein by a new mode of imaging for STEM. The EMBO Journal, 1, 1: 63

Chapman,J.N.; Craven,A.J. (Eds.) (1984) Quantitative Electron Microscopy. Proc. of the 25. Scottish Univ. Summer School in Physics, SUSSP Publication, Edinburgh

Childers, D.G. (1978) Modern spectrum analysis. IEEE-Press, N.Y.

Cliff,G.; Lorimer,G.W. (1975) J.Microsc.103: 203 , zitiert bei Lorimer (1984)

Colliex,C.; Mory,C. (1984) Quantitative aspects of scanning transmission electron microscopy. in Chapman, Craven

Crewe,A.V.; Wall,J.; Langmore,J. (1970) Visibility of single atoms. Science 168: 1338

DFVLR-Bericht (1984) Automation der Zytologischen Diagnostik. Zum Stand des Programmes "Forschung und Entwicklung im Dienste der Gesundheit".Hrsg.: DFVLR, Bereich Projektträgerschaften, Köln

Dorsten, van,A.C. (1971) Contrast phenomena in electron images of amorphous macromolecular objects. in: Valdre: EM in Material Science, Academic Press: 627

Droese,M. (1977) Stellenwert der Zytologie in der Diagnostik der Schilddrüsentumoren. Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 61: 283

Ebehard, E.H. (1968) Appl.Optics, 7,10: 2037, zit. bei Rust /1982/

Eccles,M.J.; Sin,M.E.; Tritton,K.P. (1983) Low light level detectors in astronomy. Cambridge University Press, Cambridge

Egerton,R.F. (1983) Some problems in electron energy loss spectroscopy elemental mapping and Z-contrast imaging. Inst. Phys. Conf. Ser. 68,4: 97

Egerton,R.F.(1984) Electron-loss spectroscopy. in:Chapman, Craven

Elias, P. (1953) Optics and communication theory. J.opt.Soc.Am. 43,4: 229

Engel,A. (1978) Molecular weight determination by scanning electron microscopy. Ultramicroscopy 3: 273

English,C.A.; Venables,J.A. (1971) The use of channel plates as image intensifiers in EM. Proc. 25th Anniversary Meeting of Emag. Inst. of Physics: 40

Erasmus, S.J. (1982) Reduction of noise in TV rate electron microscope images by digital filtering. *AJ. Microscopy*, 127: 29

Erhardt, R. (1980) Analyse und Entwurf optoelektronischer Systeme zur schnellen digitalen Bilderfassung und -verarbeitung. Dissertation, Univ. Stuttgart

Euroatlas (1978) Techn. Mitteilungen : LLL-TV applications in microscopy, Bremen

Favre, A.; Keller, H.J. (1981) Local Image Transformation: An Application in Biological Electron Microscopy. *Patt. Recognition* 13, 2: 177-187

Felten, K. (1981) Optimalfokusbestimmung bei elektronenmikroskopischen Fokusserien. Dissertation, Universität Bremen

Foith, J.P. (1978) Ein hierarchisches Textur-Modell. Informatik-Fachbericht 17, Bildverarbeitung und Mustererkennung, Springer Verlag: 252-259

Frank, J. (1980) The Role of Correlation Techniques in Computer Image Processing in: Hawkes, P.W.: 210

Frieden, B.R. (1972) Restoring with maximum likelihood and maximum entropy, *J.opt.Soc.Am* 62,4: 511

Frieser, H. (1975) Photographische Informationsaufzeichnung. R. Oldenbourg Verlag, München

Gerchberg, R.W.; Saxton, W.O. (1972) A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures. *Optik*, 35,2: 237-246

Geuen, W.; Widzgowsky, E. (1982) A simple edge detection algorithm on the basis of visual contour perception. *Proc. 6th. int. Conf. Patt. Recog.*, München: 843

Glick, D. (1977) Measurements of mass in quantitative histochemistry and cytochemistry. in: Glick und Rosenbaum (Eds.) *Techniques of biomedical and biophysical morphology*. John Wiley, N.Y.: 103
- 176 -

Haine,M.E (1955) Proc. Conf. les Techniques Recentes Microscopie Electronique et Corpusculaire. Toulouse: 601

Hall,E.L. (1979) Computer image processing and recognition. Academic Press, New York

Hanszen,K.J. (1973) Contrast transfer and image processing. in (Ed.) Hawkes, P.W.: Image processing and computer design in electron optics, Academic Press, London

Haralick,R.M.; Shanmugam,K.; Dinstein,I. (1973) Textural features for images classification. IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics, SMC-3: 610-621

Harms,H. (1982) Neue Verfahren in der Bildverarbeitung, insbesondere in der lichtmikroskopischen Zellbildklassifizierung. Dissertation Bremen

Hawkes,P.W. (1980) Computer processing of electron microscope images. Topics in Current Physics, Springer Verlag, Berlin

Hawkes,P.W. (1984) Processing electron images. in: Chapman, Craven

Heel,van,M. (1981) Image Formation and Image Analysis in EM. Dissertation Groningen

Hedinger,C.; Sobin;L.M. (1974) Histologic typing of thyroid tumours. International Histologic Classification of Tumours, No. 11, WHO Geneva

Herrmann, K.H. (1984) Detection Systems. in: Chapman, Craven

Herrmann,K.H.; KrahI,D. (1982) The detection quantum efficiency of electronic image recording systems. J. Microscopy, 127: 17

Herrmann,K.H.; KrahI,D.; Kübler,A.; Rindfleisch,V. (1971) Image Recording with Semiconductors Detectors and Video Amplification Devices. in: Valdre,U.: EM in Material Sciences. Academic Press: 237

Hobbs,L.W. (1984) Radiation effects in analysis by TEM.
in: Chapman and Craven: 399

Hoppe, W. (1974) Towards three-dimensional "electron microscopy"
at atomic resolution. Naturwiss. 61: 239

Hoppe,W.; Langer,R.; Knesch,G.; Poppe;C. (1968) Protein Kristall-
strukturanalyse mit Elektronenstrahlen. Naturwiss. 55: 333

IEEE (1979) Programs for digital signal processing. (Ed.) Digital
processing comittee of IEEE. J.Wiley Inc., New York

Inokuti,M.; Dehmer,J.L.; Baer,T.; Hanson,J.D. (1981) Phys.Rev.
A 23: 95 zitiert bei Egerton /1983/

Jarvis,R.A. (1976) Focus optimisation criteria for computer image
processing. The Microscope, 24: 163-180

Jones,G.R. (1959) Quantum Efficiency of Human Vision.
J.Opt.Soc.Am.49,7:645

Julesz,B. (1975) Experiments in the visual perception of texture.
Scientific American, 232,4:34

Julesz,B. (1981) Textons, the elements of texture perception and
their interactions. Nature, 290:91

Klug,A.; Berger,J.E. (1964) An optical method for the analysis of
periodicities in electron micrographs, and some mechanism of
negative staining. J.molec.Biol. 10:565

Korn,A.; Schönbein, R. (1983) Formmerkmale und deren statistische
Verteilung zur Texturbeschreibung in verschiedenen Ortsfrequenz-
bereichen. VDE-Fachberichte 35, VDE-Verlag, Berlin

Kriete,A. (1981) Die laterale Hemmung in der visuellen Infor-
mationsverarbeitung und ihre Anwendung als Fokuskriterium.
Diplomarbeit, Universität Bremen

- Kriete,A.; Boseck,S. (1982) Optical and information theoretical aspect of lateral inhibition. *Optik* 61,4: 385
- Kriete,A.; Haucke,M.; Gerlach,B.; Harms,H.; Aus,H.M., Boseck,S. (1984) A preprocessing method for the contrast enhancement of TV-scanned electron microscopic images. *Patt.Recog.* 17,3: 305
- Kriete,A.; Romen,W.; Schäffer,R.; Harms,H.; Haucke,M.; Gerlach,B.; Aus,H.M.; ter Meulen,V. (1983) Computer Analysis of Chromatin Arrangement and Nuclear Texture in Follicular Thyroid Tumours. *Histochem.* 78: 227-230
- Kriete,A.; Schäffer,R.; Harms,H.; Aus,H.M. (1985) Computer based cytophotometric classification of thyroid tumors in imprints. *J.Cancer Res. Clin.Oncol.* 109: 252
- Kühl,W. (1978) Fernsehaufnahmeröhren für niedrige Strahlungsleistungen in LLL-TV-Systemen, *Valvo-Berichte XVII.1:1*
- Kunath,W.; Weiss,K.; Sack-Kongehe,H.; Zeitler,E. (1984) On-line image recording and processing of TEM-image sequences. 8th. Int. Congress of Electron Micr., Budapest: 289
- Lang,W.; Atay,Z.; Georgii,A. (1978) Die cytologische Unterscheidung follikulärer Tumoren der Schilddrüse. *Virchows Arch.A.* 385: 125
- Lang,W; Georgii,A.; Atay,Z.: Differentialdiagnose zwischen atypischen Adenom und follikulärem Karzinom der Schilddrüse. *Verh.dtsch.Ges.Pathol.*, Fischer Verlag: 275
- Leapman,R.D.; Fiori,C.E.; Swyt,C.R. (1984) Mass thickness determination by electron energy loss for quantitative X-ray microanalysis in biology. *J.Microscopy*, 133: 239
- Lenz,F. (1954) Zur Streuung mittelschneller Elektronen in kleinste Winkel. *Zeitschr. f. Naturf.* 3, 9a: 155

Lenz,A. (1971) Transfer of image information in the electron microscope. in: (Ed.) Valdre: Electron microscopy in material science. Academic Press: 541

Linders,P.W.; Stols,A.L.H.; Stadhouders,A.M. (1983) Calibration of transmission electron microscopic mass determination using objects with known mass distribution. J. Microscopy, 130, 1: 85

Linders,P.W.; Stols,A.L.H.; van de Vorstenbosch,R.A.; Stadhouders,A.M. (1982) Mass determination of thin biological specimens for use in quantitative electron probe X-ray microanalysis. Scanning Electron Microscopy, 5: 1603

Linders,P.W.; Zahniser,D.J.; Stols,A.L.H.; Stadhouders,A.M. (1982) Improved mass determination of isolated biological objects by TEM and scanning microdensitometry. J. of Histochem. and Cytochem., 30, 7: 637

Linfort, E.H. (1956) Transmission factors and optical design. J.opt.Soc.Am. 46,9: 740

Linfort, E.H. (1959) Information theory and photographic images. J. phot. Sciences, 7:148

Linfort, E.H. (1960) Qualitätsbewertung optischer Bilder. Vieweg und Sohn, Braunschweig

Lorimer,G.W. (1984) Quantitative X-ray microscopy of thin specimen. in: Chapman, Craven

Löwhagen,T.; Sprenger,E. (1974) Cytologic presentation of thyroid tumours in aspiration biopsy smear. Acta Cytol. 18: 192

Mandel, L. (1959) Brit.J.Appl.Phys.,Vol.10, zit. bei Rust /1982/

Marr,D. (1982) Vision.Freeman, San Franzisko

Matsuyama,T.; Miura, S.I.; Nagao, M. (1983) Structural Analysis of Natural Textures by Fourier Transformation. Computer Vision, Graphics and Processing 24:347-362

Müller,H.A. (1980) Die Feinnadelpunktion der Schilddrüse aus der Sicht des Cytologen. Nuklearmediziner 3: 261

Niederdrenk,K. (1982) Die endliche Fourier- und Walsh-Transformation mit einer Einführung in die Bildverarbeitung. Vieweg, Braunschweig

Niedrig,H. (1982) J.Appl.Phys. 53, zitiert bei Reimer,L. (1984) Scanning electron microscopy. in: Chapman, Craven

Oppenheim, A.V.; Lim, S.J. (1981) The Importance of Phase in Signals. Proc. IEEE 69,5: 529-541

Ottensmeyer,F.P.; Bazett-Jones,D.P.; Rust,H.P.; Weiss,K.; Zemlin,F.; Engel,A. (1978) Radiation exposure and recognition of electron microscopic images of protamine at high resolution. Ultramicroscopy, 3:191

Pratt,W.K. (1978) Digital image processing. J.Wiley, New York

Reimer,L. (1967) Elektronenoptische Untersuchungs- und Präparationsmethoden, 2.Aufl., Springer, Berlin

Reimer,L. (1983) Scanning Electron Microscopy. in: Chapman, Craven

Reimer,L. (1984) Transmission Electron Microscopy, Springer, Berlin

Reinhardt,E.R; Sträble,G. (1981) Die Beurteilung von Bildverarbeitungsprozessen mit informationstheoretischen Maßen. DFG-Kolloquium Digitale Signalverarbeitung, Göttingen

Röhler,R. (1967) Informationstheorie in der Optik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Rose,A. (1948) The Sensitivity Performance of the human eye on an absolute scale. J.Opt.Soc.Am.,38,2: 196

Rossmann,K. (1962) Modulation transfer function of radiographic systems using fluorescent screens. J.opt.Soc.Am. 52,7: 774

Rossmann,K. (1962) Recording X-ray quantum fluctuations in radiographs. J.opt.Soc.Am. 52,10: 1162

Rust,H.P. (1982) Entwicklung eines elektronischen Bildregistriersystem für die Elektronenmikroskopie und dessen Untersuchung und Erprobung. Dissertation TU Berlin

Rust,H.P.; Krah1,D. (1982) On-line recording and processing of CTEM images.Ultramicroscopy, 8: 287

Stieve, F.E (1966) Bildgüte in der Radiologie.
Fischer-Verlag, Stuttgart

Sullivan,G.D. (1982) Perceptual Filters. in Braddick, Sleigh:
Physical and biological processing of images, Springer,N.Y.: 115

Thon, F. (1971): Phase contrast in electron microscopy, in:
(Ed.) Valdre: Electron microscopy in material science, Academic
Academic Press, New York, 571

Unwin, P.N.; Klug,A. (1974) Electron Microscopy of the stacked
disk aggregate of tobacco mosaic virus protein. J.Mol.Biol.87: 641

Watanabe,S. (1981) Pattern recognition as a quest for maximum
entropy, Patt.Recog. 13,5: 381

Watt,R.J.; Morgan,M.J. (1983) The recognition and representation of
edge blur:Evidence for spatial primitives in human vision.
Vis.Res. 23,12: 1465

Weszka,J.S.; Dyer, C.R.; Rosenfeld,A.(1976) A comparative study
of texture measures of terrain classification. IEEE Trans SMC,
6,4: 269

Wiener, N. (1953) Optics and the theory of stochastic processes.
J.opt.Soc.Am. 43,4: 225

Wolf, B. (1983) Halbautomatisches intelligentes Morphometer für
elektronenmikroskopische Aufnahmen und "on-line" Morphometrie
am Elektronenmikroskop. Mikroskopie 40:193-202

Wolff, H.P; Wollnack, J. (1984) Das Oppenheimsche Rekonstruktions-
verfahren in der Bildverarbeitung. Diplomarbeit, Univ. Bremen

Wood, J.E; Williams, P.E.; Goldstein, J.I. (1981) zitiert bei
Lorimer, G.W. (1984) Quantitative X-ray microanalysis of thin
specimens. in Capman, Craven

Zeitler, E.; Bahr, G.F. (1962) A photometric procedure for weight
determination of submicroscopic particles, quantitative EM.
J. of Appl. Phys., 3, 33: 847

Zeitler, E.; Bahr, G.F. (1967) Trockengewichtsbestimmungen mit dem
Elektronenmikroskop. Eine photometrische Bestimmung. Zeiss-
Mitteilungen 4, Heft 6

Zweig, H.J.; Barret, E.B.; Hu, P.C. (1975) Noise - cheating
image enhancement. J.opt.Soc.Am. 65,11: 1347

Lebenslauf

Name:	Kriete
Vorname:	Andres
11.Mai 1956	geboren in Bremen
	Eltern: Herwin Kriete, Amtsrat Ursula Kriete geb. Wischnowski
April 63 - Juni 67	Besuch der Grundschule in Ottersberg, Krs. Verden
Okt. 67- Juni 76	Besuch des Ratsgymnasiums in Rotenburg (Wümme)
6.Mai 76	Abitur
1.Juli- 30.Sept. 76	Praktikant bei VFW-Fokker in Bremen
Oktober 76	Beginn des Physikstudiums an der Universität Bremen
Juli-Okt.77 Juli-Okt.78 Juli-Okt.79	studentischer Mitarbeiter der Universität Hamburg
Juni-Nov.81	Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. S. Boseck
10. Dez.81	Diplomprüfung
April 82 - Sept. 85	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virplogie der Universität Würzburg
seit Okt.85	Applikationsingenieur der Firma Kontron- Bildanalyse am Institut für Anatomie der Justus-Liebig-Universität Giessen

